# UNTERSUCHUNGEN ÜBER PANTOTHENSÄURE ENTHALTENDE PROTEINE IN HEFE

Wolfram Winnewisser

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535726_0055

# UNTERSUCHUNGEN ÜBER
# PANTOTHENSÄURE ENTHALTENDE PROTEINE IN HEFE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Wolfram Winnewisser

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Oesterhelt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann
Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juli 1980

Die vorliegende Arbeit wurde von September 1967 bis April 1974 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Feodor Lynen am Institut für Biochemie der Universität München, am Max-Planck-Institut für Zellchemie, München, und am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, ausgeführt.

Herrn Professor Dr. Feodor Lynen schulde ich für das Interesse und die Unterstützung, die er dieser Arbeit und mir persönlich zuteil werden ließ, großen Dank.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich den Herren Professoren Dr. G.R. Hartmann und Dr. D. Oesterhelt dafür, daß sie nach dem Tod von Herrn Professor Lynen den Abschluß der Promotion ermöglicht haben.

Frau Erika Ringelmann danke ich für ihre geschickte, zuverlässige und engagierte Mitarbeit seit September 1971 sehr herzlich.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Georg-Burkhard Kresze für die kritische Durchsicht des Manuskripts und für hilfreiche Anregungen.

INHALTSVERZEICHNIS


| | | Seite |
|---|---|---|
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| II. | BESTIMMUNG DES PANTOTHENSÄURE-GEHALTS DER FETTSÄURESYNTHETASE AUS HEFE | 7 |
| | 1. Vorbemerkung | 7 |
| | 2. Bestimmungsmöglichkeiten | 7 |
| | 3. Methode | 10 |
| | 4. Der Pantothensäure-Gehalt der Fettsäuresynthetase | 17 |
| | 5. Zur Zusammensetzung der Fettsäuresynthetase | 20 |
| III. | NACHWEIS EINES PROTEINS MIT "acyl-carrier-protein"-EIGENSCHAFTEN IN HEFE | 21 |
| | 1. Einführung | 21 |
| | 2. Nachweis eines freien ACP in Hefe | 22 |
| IV. | REINIGUNG DES FREIEN ACP AUS HEFE | 26 |
| | 1. ACP-Test | |
| | a) ACP-Abhängigkeit | 27 |
| | b) Zeitabhängigkeit | 29 |
| | c) pH-Abhängigkeit | 30 |
| | 2. Anreicherung | 31 |
| | a) Aufschluß | 31 |
| | b) Hitzedenaturierung von Fremdproteinen | 31 |
| | c) Fällung mit Säure und Ammonsulfat und selektive Extraktion | 33 |
| | d) Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose | 36 |
| | e) Gelfiltration | 37 |
| | f) Isoelektrische Fokussierung | 39 |
| | g) Präparative Disk-Elektrophorese | 41 |
| | 3. Reinheit | 41 |
| | 4. Übersicht der Anreicherung | 43 |
| | 5. Anreicherung von $^{14}$C-Pantothensäure-haltigem ACP | 44 |
| | 6. Isolierung des ACP aus E.coli | 45 |

Seite

V. MOLEKULARE EIGENSCHAFTEN DES ACP AUS HEFE 46

1. Isoelektrischer Punkt 46
2. Aminosäurezusammensetzung 46
3. Molekulargewichtsbestimmung 49
   a) Molekulargewichtsberechnung 49
   b) Thiolgruppen-Bestimmung 49
   c) Bestimmung durch Chromatographie an Molekülsieben 50
   d) Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-Gelelektrophorese 52
4. Nachweis von Serin als Bindungsstelle der prosthetischen Gruppe 53
5. Coenzymaktivität des ACP 54

VI. INTRAZELLULÄRE LOKALISIERUNG DES ACP IN HEFE 56

1. Hefesphäroplasten und Aufschluß 56
2. Fraktionierung des Zellinhalts 58
3. Ergebnis 59
4. ACP-Gehalt in Hefe unter verschiedenen Zuchtbedingungen 62

VII. VERSUCHE ZUR FUNKTION 64

1. Vorbemerkung 64
2. Isolierung und Reinigung von Mitochondrien aus Hefe 65
3. Nachweis einer Malonyl-CoA-abhängigen Fettsäuresynthese in Mitochondrien aus Hefe 67
4. Untersuchungen mit Anti-FSS- -Globulinen 74
5. Nachweis einer für langkettige Fettsäuren spezifische Acyl-CoA-Synthetase in Hefe-Mitochondrien 80
6. Versuche zur Funktion 83
7. Diskussion 95

VIII. Zusammenfassende Diskussion 99

IX. EXPERIMENTELLER TEIL 103

1. Allgemeines 103
   a) Verwendete Geräte 103
   b) Käufliche Chemikalien/Materialien 104
2. Allgemeine analytische Methoden 105
   a) Protein-Bestimmung 105
   b) $^{14}C$-Radioaktivitätsbestimmung 105
   c) Protein-gebundene Radioaktivität 106

Seite

d) Polyacrylamidgel-Elektrophoresen 106
e) Radioaktivitätsbestimmung in Polyacrylamidgelen 107

3. Synthese und Bestimmung von CoA- und Pantothensäure-Derivaten 107

a) Synthesen 107
b) Bestimmung 108

4. Enzymisolierungen 108

a) Isolierung und Aktivitätstest der Fettsäuresynthetase 108
b) "Fraktion A" aus E.coli 109
c) ACP-Bestimmung 110
d) Enzymaktivitätsbestimmungen 110

5. Züchtung von Hefe (allgemeine Angaben) 110

6. Versuchsbeschreibungen 111

a) Zu Kap. II,3 111
b) Zu III,2 114
c) Zu IV,2 116
d) Zu IV,2,a 116
e) Zu IV,2,b 116
f) Zu IV,2,c 117
g) Zu IV,2,d 117
h) Zu IV,2,e 118
j) Zu IV,2,g 119
k) Zu IV,6 120
l) Zu V,2 121
m) Zu V,3 122
n) Zu V,4 123
o) Zu VI,1 124
p) Zu VI,2 125
q) Zu VI,4 126
r) Zu VII,2 127
s) Zu VII,3 127
t) Zu VII,4 129
u) Zu VII,6 129

X. ZUSAMMENFASSUNG 131

XI. LITERATURVERZEICHNIS 134

LEBENSLAUF

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

| | |
|---|---|
| AC | Acyl Carrier |
| ACP, ACP-SH | Acyl Carrier Protein |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| CoA, CoA-SH | Coenzym A |
| $^{14}C$ | Kohlenstoffisotop 14 |
| C | Curie |
| CS | Citrat-Synthase |
| Cyt.-c | Cytochrom c |
| DEAE- | Diäthylaminoäthyl-Rest |
| DTNB | 5,5'-Dithio-bis-(2-nitro-benzoesäure) |
| E, mE | Aktivitäts-einheit, -millieinheit |
| EDTA | Äthylendiamin-tetraacetat |
| $E_x$ | Extinktion bei x nm |
| FMN | Flavinmononucleotid |
| FS | Fettsäuren |
| FSS | Fettsäuresynthetase |
| h | Stunden |
| IP | Isoelektrischer Punkt |
| Ipm | Impulse pro Minute |
| k | Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion |
| m | mitochondrial |
| MG | Molekulargewicht |
| min | Minute |
| $NAD^+$/NADH | Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidiert/reduziert |
| $NADP^+$/NADPH | Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, ox./red. |
| $P_o$ | Phosphat |
| PAS | Perameisensäure |
| SDS | Natrium-dodecylsulfat |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TCE | Trichloressigsäure |
| U, mU | Enzym-einheit, - millieinheit |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |

# I. EINLEITUNG

Das Vitamin Pantothensäure wurde 1938 von Williams (1) als Bestandteil des "Bios-Komplexes" entdeckt. Seine wichtigste Funktion im Stoffwechsel liegt darin, daß es - als 4'-Phosphopantethein - einen Baustein des Coenzyms A darstellt (2). Wie spätere Untersuchungen zeigten, ist Phosphopantethein darüber hinaus noch in proteingebundener Form in der Zelle vorhanden und konnte als Wirkungsgruppe einer Reihe von Enzymen nachgewiesen werden: 6-Methylsalicylsäure-Synthetase (3), Citrat-Lyase (4), Citramalat-Lyase (5), Gramicidin S-Synthetase (6), Tyrocidin-Synthetase (7), Bacitracin-Synthetase (8) sowie insbesondere bei allen Fettsäuresynthetasen (9-26).

Die de novo-Biosynthese gesättigter Fettsäuren erfolgt in einer mehrstufigen Reaktionsfolge aus den Grundbausteinen Acetyl- und Malonyl-CoA gemäß folgender Bilanzgleichung (Gleichung 1):

(1)
$$\text{Acetyl-CoA} + n\ \text{Malonyl-CoA} + 2n\ \text{NADPH} + 2n\ H^+ \longrightarrow$$
$$CH_3\text{-}(CH_2\text{-}CH_2)_n\text{-}CO\text{-}SCoA + n\ CO_2 + n\ \text{CoA} + 2n\ NADP^+ + n\ H_2O$$

Während aus Rohextrakten prokaryotischer und pflanzlicher Zellen mit konventionellen Methoden der Proteinfraktionierung differente Einzelenzyme erhalten wurden, die die verschiedenen Teilschritte der Synthese katalysieren, konnte aus Hefe im Laboratorium von Lynen (16,27) ein stabiler Multienzymkomplex mit einem Molekulargewicht von 2,3 Millionen

Dalton isoliert werden. Dieser enthält alle zur Synthese von Palmityl- (n = 7) und Stearyl-CoA (n = 8), den hauptsächlich auftretenden Endprodukten, notwendigen Enzymkomponenten und wurde als Fettsäuresynthetase (FSS) bezeichnet. Wie die intensiv durchgeführten Untersuchungen weiter zeigten, treten während des Syntheseprozesses Zwischenprodukte nicht in freier Form auf; sie sind vielmehr durch Thioesterbindungen mit dem Enzym kovalent verknüpft. An der Bindung sind dabei zwei Typen von Enzymthiolgruppen beteiligt, die auf Grund ihrer unterschiedlichen Funktion als periphere und zentrale SH-Gruppe bezeichnet wurden.

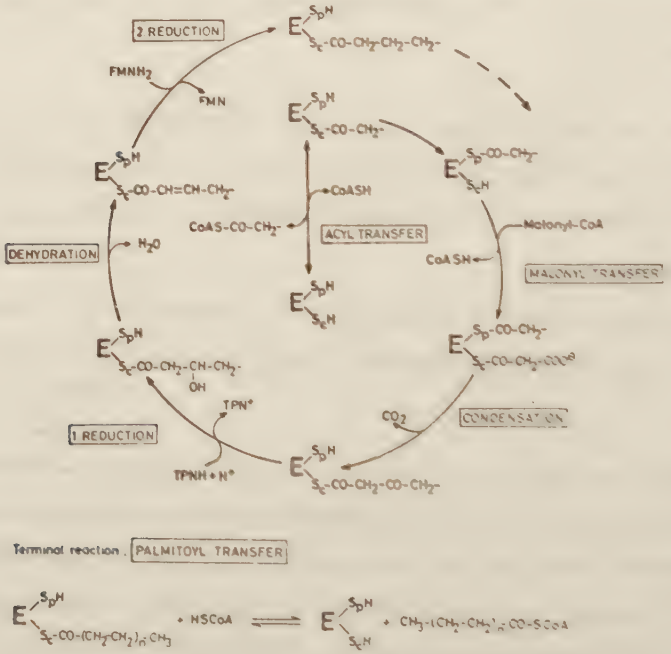



Abb. 1: Reaktionsschema der Fettsäuresynthese nach Lynen

Der Syntheseprozeß konnte mit Hilfe von Modellsubstraten von Lynen und Mitarbeitern in eine sich wiederholende Folge chemischer Umsetzungen aufgegliedert werden, die kurz beschrieben werden sollen (Abb. 1).

Die Synthese wird durch Übertragung eines Acetylrestes von CoA über die zentrale SH-Gruppe auf die periphere SH-Gruppe gestartet. Ebenfalls von CoA wird ein Malonylrest auf die zentrale SH-Gruppe übertragen. Danach erfolgt die Kondensation zum Acetacetylrest unter $CO_2$-Abspaltung. Die weiteren Schritte stellen im Wesentlichen eine Umkehrung der ß-Oxidation dar: Reduktion zum ß-Hydroxybutyrylrest, Dehydratisierung zum Crotonylrest und schließlich Hydrierung zum Butyrylrest.

Damit ist wieder ein gesättigter, um eine $C_2$-Einheit verlängerter Acylrest entstanden. Dieser wird wiederum auf die periphere SH-Gruppe übertragen und durch mehrmalige Wiederholung der geschilderten Reaktionsfolge stufenweise um $C_2$-Einheiten verlängert. Bei einer Kettenlänge von 16 bzw. 18 C-Atomen wird die Synthese durch Übertragung des Acylrests von der zentralen Thiolgruppe auf CoA-SH beendet.

Die funktionell verschiedenen Enzymthiolgruppen sind auch chemisch verschieden. Die periphere SH-Gruppe wird durch einen Cysteinrest gebildet und ist Bestandteil der kondensierenden Enzymkomponente. Die zentrale SH-Gruppe hingegen konnte als Phosphopantethein identifiziert werden, das durch eine Phosphodiesterbindung mit einem Serinrest der Polypep-

tidkette verknüpft ist. Hierdurch bildet die prosthetische Gruppe innerhalb des Multienzymkomplexes einen flexiblen Schwingarm mit einer Länge bis zu 20 Å. Auf diese Weise wird den während der gesamten Synthese kovalent daran gebundenen Zwischenprodukten der Kontakt mit den verschiedenen, räumlich getrennten aktiven Zentren der einzelnen Teilenzyme ermöglicht. Abb. 2 gibt schematisch die Funktion des Phosphopantethein wieder.

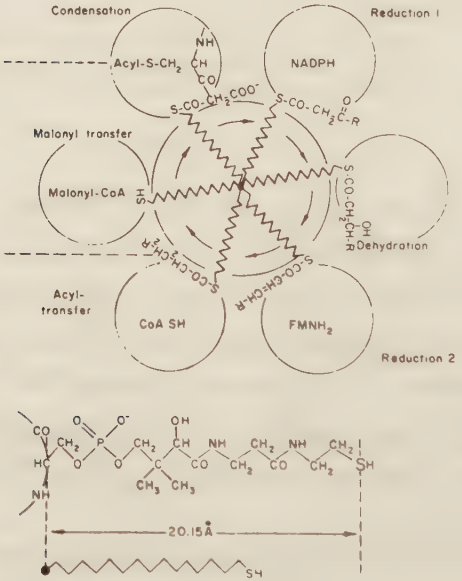



Abb. 2: Struktur und Funktion des Phosphopantethein in dem Fettsäuresynthetase-Komplex aus Hefe

Das Reaktionsschema der FS-Biosynthese in Prokaryoten - am besten ist sie in E. coli untersucht (Übersicht in 28) - besitzt eine auffallende Ähnlichkeit zu dem von Lynen vorgeschlagenen Weg. Diejenige Komponente des Fettsäuren-synthetisierenden Enzymsystems, deren Wirkungsgruppe der Pantetheinrest ist und die während der gesamten Synthese als Träger der Intermediärprodukte dient, wurde ihrer Funktion entsprechend als "acyl-carrier-protein" (ACP) bezeichnet (29).

Während die Wirkungsweise der FSS aus Hefe gut untersucht war, lagen zu Beginn dieser Arbeit über den Aufbau des Multienzymkomplexes auf molekularer Ebene keine schlüssigen Ergebnisse vor. Wenn FSS aus einzelnen, funktionsfähigen Grundeinheiten aufgebaut ist, sollte mindestens eine ACP-Komponente pro Untereinheit vorhanden sein. Die Bestimmung des Phosphopantethein-Gehalts und damit der ACP-Komponente kann daher zur Aufklärung der molekularen Struktur und der stöchiometrischen Verhältnisse des Enzyms beitragen (Kap. II).

Multienzymkomplexe sind aus zwei oder mehreren verschiedenen Polypeptidketten aufgebaut, die durch nicht kovalente Bindungen zusammengehalten werden, und katalysieren zwei oder mehrere Teilschritte einer Reaktionskette. Ein wesentliches Merkmal der Multienzymkomplexe ist, daß die verschiedenen Komponenten, soweit untersucht, stets in einem zueinander konstanten Verhältnis enthalten sind (30,31).

Eine offene Frage ist es, auf welche Weise die Biosynthese der einzelnen Polypeptidketten reguliert und koordiniert wird. Die Existenz entsprechender Regulationsmechanismen geht aus Arbeiten von Henning et al. (32) hervor, in denen gezeigt wurde, daß bei der Biosynthese des Multienzymkomplexes Pyruvat-Dehydrogenase aus E. coli, dessen einzelne Teilenzyme wahrscheinlich in einem ungleichen molaren Verhältnis am Aufbau des Komplexes beteiligt sind (33), keine der Einzelkomponenten im Überschuß gebildet wird.

Im Falle der FSS aus Hefe war die Existenz eines ACP-Pools trotzdem nicht auszuschließen. Die weiteren Untersuchungen galten daher der Suche nach einem "freien" ACP in der Hefezelle, seiner Isolierung und Charakterisierung. Die Ergebnisse dieser Experimente werden in den Kap. III - VII beschrieben.

## II. BESTIMMUNG DES PANTOTHENSÄURE-GEHALTS DER FETTSÄURESYNTHETASE AUS HEFE (34)

### 1. Vorbemerkung

Nachdem die Charakterisierung der verschiedenen Substratbindungsstellen der FSS in einer Reihe früherer Arbeiten (35-38) gelungen war, versprach deren quantitative Bestimmung, weitere Einblicke in den Aufbau des Multienzymkomplexes zu vermitteln. Der zentralen Thiolgruppe kommt hierbei auf Grund ihrer Funktion als Träger der wachsenden Acylkette besondere Bedeutung zu.

Zu Beginn unserer Untersuchungen lagen über die stöchiometrische Zusammensetzung des Komplexes widersprüchliche Befunde vor. Während Wells et al. (14,15) aus dem Einbau von $^{14}$C-Pantothensäure an Hand der spezifischen Radioaktivität einen Gehalt von 3 Pantetheinresten pro FSS-Molekel berechneten, ermittelten Schweizer et al. (17) durch Aminosäureanalyse Werte zwischen 3,3 und 5,8 Mol ß-Alanin pro Mol Synthetase. Um in diesem Punkt Sicherheit zu erlangen, war eine verbesserte Bestimmung des Pantethein-Gehalts der FSS notwendig.

### 2. Bestimmungsmöglichkeiten

Eine quantitative Bestimmung der ACP-Komponente ist auf dem Weg über ihre funktionelle Gruppe, das 4'-Phosphopantethein,

möglich (vgl. Abb. 2, S.4 und Abb. 3, S. 11 ). Folgende Bestandteile könnten nach bekannten Methoden durch quantitative Analyse erfaßt werden: die Einzelbausteine Phosphat, Pantoinsäure, ß-Alanin und Cysteamin; sowie die zusammengesetzten Verbindungen Pantothensäure und Pantethein.

Phosphat - als Differenz aus Gesamtphosphat und Orthophosphat nach Abspaltung von FMN - ist von allen aufgezählten Bausteinen die am wenigsten spezifische Komponente und kam daher nicht in Frage. Eine Bestimmung von ß-Alanin und Cysteamin, das nach Oxidation mit Perameisensäure als Taurin nachgewiesen wird, im Aminosäureanalysator nach Totalhydrolyse hielten wir wegen des geringen Anteils dieser seltenen Aminosäuren an der Gesamtzusammensetzung für nicht zweckmäßig. Um sie mit hinreichender Genauigkeit quantitativ analysieren zu können, wäre es erforderlich gewesen, prosthetische Gruppe und Protein vor der Hydrolyse zu trennen. Ausbeute und Reproduzierbarkeit dieses zusätzlichen Trennungsschrittes waren unsicher. Zudem hätte eine Bestimmung nach diesem Verfahren gegenüber den von Schweizer et al. (17) schon früher ausgeführten Analysen keinen Fortschritt bedeutet.

Pantoinsäure kann als Pantolakton gaschromatographisch bestimmt werden. Auch bei dieser Methode ist jedoch ein Trennungsschritt (als Extraktion) erforderlich.

Pantothensäure und Pantethein lassen sich durch sehr empfindliche und spezifische mikrobiologische Bestimmungen erfassen,

die durch die Anwesenheit von Protein nicht gestört werden. Gerade in komplex zusammengesetzten Proben haben sich daher mikrobiologische Verfahren trotz ihrer Aufwendigkeit durchgesetzt. Es ist allerdings kein Testorganismus bekannt, der ausschließlich spezifisch für nur eine der beiden Verbindungen ist (39).

Für die geplanten Untersuchungen wählten wir die mikrobiologische Pantothensäure-Bestimmung mit Lactobacillus plantarum als Testkeim.

Ein weiterer Weg, über Pantothensäure den ACP-Gehalt der FSS ermitteln zu können, erschien von der experimentellen Seite her als einfach und wurde auch anfangs eingeschlagen.

Durch Züchten von Hefe auf radioaktiv markierter Pantothensäure und anschließender Isolierung der markierten FSS daraus lassen sich anhand der spezifischen Radioaktivität der verwendeten Pantothensäure quantitative Aussagen treffen. Voraussetzung dafür ist ein Hefestamm, der strikt Pantothensäure-abhängig (heterotroph) ist: Geschwindigkeit und Ausmaß des Wachstums müssen also bei limitierender Pantothensäurekonzentration von dieser bestimmt werden.

Es wurden einige, in Bezug auf Pantothensäure als auxotroph ausgewiesene Hefestämme hinsichtlich dieser beiden Bedingungen untersucht. Dabei zeigte sich, daß bei Abwesenheit von Pantothenat lediglich verlangsamtes Wachstum -

nach einer verlängerten Adaptationszeit (lag-Phase) - auftrat.

Bei Verwendung solcher Stämme war daher eine unkontrollierbare Verdünnung der eingesetzten radioaktiven Pantothensäure zu erwarten (vgl. 14,15,40). Andrerseits gestaltete sich die Suche nach einem geeigneten, im Wachstum streng pantothensäureabhängigen Hefestamm recht langwierig; ein schließlich von uns gefundener entsprechender Stamm (vgl. III,2) erwies sich als genetisch instabil. Wir zogen es deshalb vor, einen anderen Weg einzuschlagen.

### 3. Methode

Eine Bestimmung der proteingebundenen Pantothensäure setzt eine zuverlässige Freisetzung des Vitamins aus dem Enzym voraus.

Diese wurde auf folgendem Weg (Abb. 3) erreicht: Phosphopantethein kann als leicht austretende Gruppe durch Behandlung mit Alkali unter milden Bedingungen vom Serinrest abgespalten werden (11). Es handelt sich dabei um eine Eliminierungsreaktion, bei der ein Dehydroalaninrest entsteht. Anschließend wird die freigesetzte prosthetische Gruppe nach einer von Novelli et al. (41) beschriebenen Methode enzymatisch in Pantothensäure gespalten. Diese kann sodann mikrobiologisch bestimmt werden.

Der besondere Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit, Pantothenat ohne Trennungsoperationen spezifisch zu erfassen.

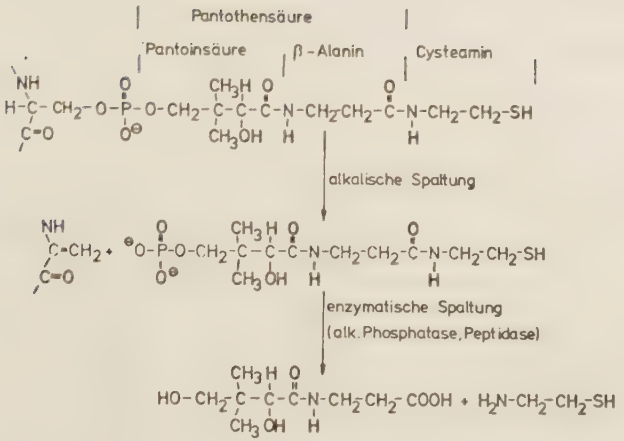



Abb. 3: Schema der Pantothensäure-Freisetzung aus FSS

Vor Anwendung dieses Verfahrens war es erforderlich,

a) die Zuverlässigkeit der mikrobiologischen Pantothenat-Bestimmung zu überprüfen;

b) die günstigsten Bedingungen für die enzymatische Freisetzung des Pantothenats aus Phosphopantethein und

c) für die alkali-katalysierte Eliminierung des Phosphopantethein zu ermitteln, sowie

d) ein Korrekturverfahren für hierbei auftretende Verluste zu entwickeln.

a) Die Zuverlässigkeit der mikrobiologischen Pantothenat-Bestimmung überprüften wir mit CoA, das noch nach zwei anderen Methoden enzymatisch analysiert wurde: einmal mit Phosphotransacetylase (PTA) (42) und zum anderen nach Aceto-

acetylierung mit Diketen mit Hilfe von ß-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (HOADH) (43). Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: CoA-Bestimmungen nach verschiedenen Methoden

| Methode | Gehalt [µMol] | auf die Einwaage bezogen [%] |
|---|---|---|
| PTA (42) | 9,23 | 70,7 |
| HOADH (43) | 10,0 | 76,6 |
| mikrobiol. (44) | 10,76 | 82,5 |

Die etwas differierenden Werte lassen sich durch die unterschiedlichen Spezifitäten der verwendeten Enzyme erklären: Während mit PTA spezifisch intaktes CoA erfaßt wird, sind in dem mit HOADH ermittelten Wert zudem noch Dephospho-CoA und Pantethein enthalten (42,43) . Bei der mikrobiologischen CoA-Bestimmung werden alle pantothenathaltigen Verbindungen erfaßt. Der mit dieser Methode gefundene höhere Gehalt dürfte auf die Anwesenheit von oxidierten Verbindungen (Disulfide) zurückzuführen sein.

Auf Grund der insgesamt zufriedenstellenden Genauigkeit betrachteten wir die mikrobiologische Pantothensäure-Bestimmung für die weiteren Untersuchungen als geeignet.

b) Mit einer Mischung von CoA und Serumalbumin als Modell für die FSS ermittelten wir die Inkubationsdauer, die zur vollständigen enzymatischen Hydrolyse des Phosphopantetheins zu Pantothenat erforderlich war.

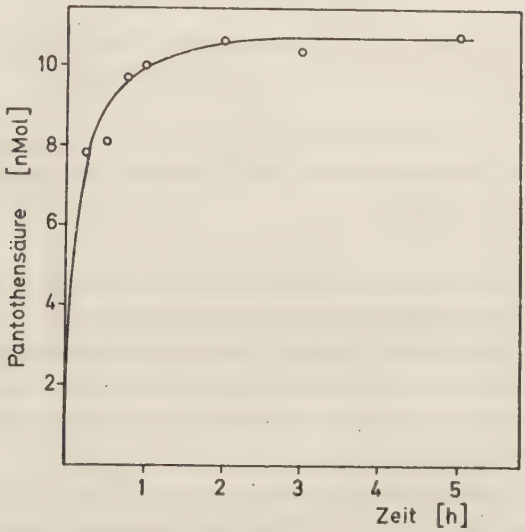



Abb. 4: Zeitabhängigkeit der enzymatischen Hydrolyse von CoA zu Pantothensäure

Der Ansatz (6ml) enthielt: 12,5 µg/ml CoA, 8,3 mg/ml Serumalbumin, 100 mM Tris-Puffer, pH 8,3, je 1 mM $Mg^{2+}$ und $Zn^{2+}$, 15 µg/ml alkalische Phosphatase, 2,5 mg/ml Rohextrakt aus Hühnerleber. Zu den angegebenen Zeiten wurden jeweils 0,7 ml entnommen und hitzedenaturiert. Freigesetzte Pantothensäure wurde nach Verdünnen der Proben in den Meßbereich des mikrobiologischen Tests nach dieser Methode bestimmt.

Zur Spaltung wurde eine aus Hühnerleber gewonnene Peptidase verwendet (45). Da der dieses Enzym enthaltende Rohextrakt noch 0,4-0,5 nMol Pantothenat/mg Protein enthielt, wurde die zur Spaltung eingesetzte Menge so niedrig gehalten, daß der damit eingeschleppte Pantothensäuregehalt maximal 10 % der zu bestimmenden Proben betrug (Blindwert, der in einer gesonderten Probe jeweils bestimmt wurde).

Wie Abb. 4 zeigt, war unter diesen Bedingungen nach zwei Stunden CoA vollständig zu Pantothensäure abgebaut.

Die daraufhin als Standardbedingungen (s.S. 17 ) gewählte Inkubationszeit von mindestens fünf Stunden gewährleistete eine vollständige Spaltung.

c) Da einige Versuche, Pantethein auf rein enzymatischem Weg mit alkalischer Phosphatase, Phosphodiesterase oder einem Gemisch von beiden Enzymen aus der FSS freizusetzen, keine befriedigenden Ergebnisse erbrachten, mußte die Abspaltung der prosthetischen Gruppe durch Alkali vorgenommen werden (Abb. 3, S.11 ).

Um die für die Eliminierung geeigneten Bedingungen zu ermitteln, bestimmten wir aus FSS freigesetztes Phosphopantethein als Pantothensäure in Abhängigkeit von der Dauer der Alkalieinwirkung (Abb. 5, Kurve I).

Es ist ersichtlich, daß nach 90 Minuten die Abspaltung der prosthetischen Gruppe beendet ist.

d) Das allmähliche Absinken des gefundenen Pantothenat-Gehalts bei längerer Inkubationsdauer (Abb. 5) führen wir darauf zurück, daß neben der schnellen Abspaltung des Phosphopantetheins eine langsame Zerstörung der Pantothensäure abläuft.

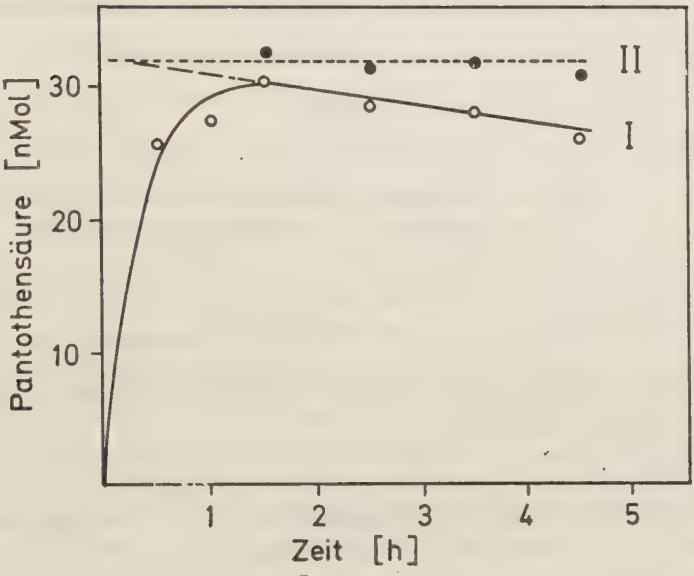



Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der Phosphopantethein-Eliminierung aus FSS durch Alkali
Kurve I: gefundene Werte; Kurve II: korrigierte Werte (s. Tab. 2). Durchführung: Standardansatz, s.S. 17 doppelter Ansatz: 14,7 mg FSS.

Um den während der Eliminierung der prosthetischen Gruppe durch KOH zerstörten Pantothenatanteil erfassen zu können, wurde einerseits der verbleibende Vitamingehalt der FSS in Abhängigkeit zur Dauer der Alkali-Einwirkung bestimmt und die gefundenen Werte auf t = O extrapoliert (Kurve I, Abb. 5). Zusätzlich als Kontrolle war es zweckmäßig, wieder das FSS-Modellsystem CoA und Serumalbumin zu verwenden. Da die Reaktion wegen des großen Laugenüberschusses

einer Kinetik pseudo-1.-Ordnung folgt, läßt sich aus den zu verschiedenen Zeiten gefundenen Pantothenat-Restmengen nach der Gleichung 2 die Geschwindigkeitskonstante der

$$(2) \qquad k\ t = \ln \frac{a}{a - x}$$

(mit a = Anfangskonzentration an Pantothenat;
x = zur Zeit t zerstörtes Pantothenat)

Pantothenat-Zerstörung berechnen (Tab. 2); ihr Mittelwert ergab sich zu $k = 6{,}14 \cdot 10^{-4} \cdot min^{-1}$. Mit diesem Wert korrigierten wir die Pantothenat-Gehaltsbestimmungen der FSS (Abb. 5, Kurve II).

Tab. 2: Pantothensäuregehalt von CoA in Abhängigkeit der Dauer der Alkibehandlung

| Dauer der Alkalibehandlung [h] | Pantothenat [nMol] | [%] | k [$10^{-4}$/min] |
|---|---|---|---|
| 0 | 29,2 | 100 | -- |
| 2 | 27,2 | 93,8 | 6,53 |
| 3 | 26,3 | 90,1 | 5,8 |
| 4 | 25,3 | 86,7 | 6,0 |
| 6 | 23,3 | 79,8 | 6,23 |

Mittelwert: $k = 6{,}14 \cdot 10^{-4}/min$

Der durch Extrapolieren gefundene Wert von 31,6 nMol (Abb. 5,I) stimmt gut mit dem Mittelwert von 31,4 nMol überein, der aus den korrigierten Werten gebildet wurde (Abb. 5, II). Damit ist die Zuverlässigkeit des Korrekturverfahrens erwiesen.

Auf Grund der unter b) - d) beschriebenen Ergebnisse wählten wir für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen folgende Standardbedingungen: FSS (6-10 mg) wird im Volumen von 0,5 ml mit 200 µMol KOH versetzt und zur Phosphopantethein-Eliminierung mindestens 90 Minuten lang bei 40° C inkubiert. Anschließend werden (in dieser Reihenfolge) 100 µMol Tris-Puffer, pH 8,3, 1 µMol $Mg^{++}$, 1 µMol $Zn^{++}$, 100 µMol $H_2SO_4$, 15 µg alkalische Phosphatase und 2,5 mg Hühnerleber-Rohextrakt zugegeben. Nachdem mit Wasser auf 1,0 ml aufgefüllt wurde, werden die Proben zur enzymatischen Hydrolyse mindestens 5 h bei 37° C gehalten. Die freigesetzte Pantothensäure wird dann mikrobiologisch bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden mit Hilfe der Geschwindigkeitskonstanten der Pantothenat-Zerstörung $k = 6{,}14 \cdot 10^{-4} \cdot min^{-1}$ korrigiert.

## 4. Der Pantothensäure-Gehalt der Fettsäuresynthetase

Die Ergebnisse der nach dem beschriebenen Verfahren ausgeführten Pantothenat-Bestimmungen sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Die bei diesen Versuchen eingesetzten Präparate verhielten sich in der analytischen Disk-Elektrophorese einheitlich. Den Berechnungen wurde ein Molekulargewicht von 2,3 Millionen Dalton (46,47) zugrundegelegt. Als Maß für die Genauigkeit (Reproduzierbarkeit) der Werte wurde die durchschnittliche Abweichung DA (48,49) angegeben.

Bei zwei reinen FSS-Präparaten wurde unabhängig voneinander als Mittelwert von jeweils 8 Bestimmungen 4,9 bzw. 5,0 Pantetheinreste pro FSS-Molekül gefunden.

Einige weitere Gehaltsbestimmungen mit Enzympräparaten sehr hoher spez. Aktivität (Tab. 3, c und d), denen allerdings nicht die gleiche Aussagekraft zukommt (Einzelbestimmung), ergaben Werte von 5,2 bzw. 5,6 Mol Pantothensäure pro Mol FSS.

Auf Grund dieser Befunde kommen wir zu dem Schluß, daß FSS aus Hefe mindestens 5 Pantetheinreste - und damit ACP-Komponenten - enthält.

Tab. 3: Pantothensäuregehalt der FSS aus Hefe

a) Enzympräparat I , spez. Akt. 2 400 mU/mg, je 5,55 mg
b) " II, " " 1 800 " , je 7,47 mg
c) " III, " " 3 200 " 10,83 mg
d) " IV, " " 3 500 " 7,06 mg

| | F S S [nMol] | Dauer der Alkalibehandlung [min] | Pantothensäure [nMol] gefunden | Pantothensäure [nMol] korr. (t=o) | Pantothens. / FSS |
|---|---|---|---|---|---|
| a | je 2,41 | 100 | 11,1 | 11,8 | 4,90 |
| | | 100 | 11,96 | 12,72 | 5,28 |
| | | 120 | 11,36 | 12,23 | 5,07 |
| | | 120 | 11,7 | 12,59 | 5,22 |
| | | 120 | 11,5 | 12,38 | 5,14 |
| | | 140 | 11,1 | 12,1 | 5,02 |
| | | 140 | 10,62 | 11,57 | 4,80 |
| | | 140 | 10,3 | 11,23 | 4,66 |
| b | je 3,25 | 90 | 15,5 | 16,38 | 5,04 |
| | | 90 | 15,52 | 16,4 | 5,05 |
| | | 105 | 15,1 | 16,11 | 4,96 |
| | | 105 | 13,95 | 14,88 | 4,58 |
| | | 105 | 15,7 | 16,75 | 5,16 |
| | | 120 | 15,27 | 16,44 | 5,06 |
| | | 120 | 14,46 | 15,57 | 4,79 |
| | | 120 | 14,82 | 15,95 | 4,91 |
| c | 4,72 | 100 | 23,3 | 24,78 | 5,25 |
| d | 3,07 | 100 | 16,12 | 17,14 | 5,58 |

Mittelwert: 5,01 $\pm$0,17 Mole Pantothensäure/Mol FSS (Präp. I )
4,94 $\pm$0,14 " " " (Präp. II)

## 5. Zur Zusammensetzung der Fettsäuresynthetase

Der FMN-Gehalt des Enzyms, der von Oesterhelt et al. (50) auf photometrischem Weg bestimmt wurde, beträgt ebenfalls 5 Mol pro Mol FSS. Wie die Untersuchungen von Ziegenhorn (51) ergaben, besitzt der Enzymkomplex etwa 5 nichtthiolartige Bindungsstellen für den Acetylrest.

Genetische Untersuchungen von Schweizer und Mitarbeitern konnten zeigen, daß FSS aus Hefe aus nur 2 verschiedenen multifunktionellen Polypeptidketten A und B aufgebaut (52) ist. Die mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese ermittelten Molekulargewichte der Untereinheiten von 185 000 bzw. 179 000 Dalton weisen auf eine Zusammensetzung $A_6B_6$ hin (53), während die oben mitgeteilten Befunde eher für einen pentameren Aufbau zu sprechen scheinen. Da aber die Zusammensetzung von oligomeren Proteinen aus einer geraden Anzahl von Untereinheiten als wesentlich wahrscheinlicher anzusehen ist (54), und elektronenmikroskopische Aufnahmen (55) sowie Daten von Röntgenkleinwinkelstreuungsuntersuchungen (47) für einen symmetrischen Aufbau (ellipsoider Hohlkörper) der FSS sprechen, führen wir den gefundenen Pantethein- und FMN-Gehalt auf eine nicht ganz vollständige Besetzung der Wirkungsgruppen im isolierten Enzym zurück.

## III. NACHWEIS EINES PROTEINS MIT "acyl-carrier-protein"-EIGENSCHAFTEN IN HEFE

### 1. Einführung

Zu Beginn dieser Arbeit gingen wir von der Vorstellung aus, daß die FSS der Hefe aus etwa 7 einzelnen Polypeptidketten (darunter das ACP) aufgebaut sei (56-58); über gegenwärtige Vorstellungen vom Aufbau der FSS vgl. Kap. II,5, S. 20). Um erste Erkenntnisse über die Regulation ihrer Biosynthese zu gewinnen, schien es uns nützlich, der Frage nachzugehen, ob die Enzymkomponenten von vornherein genau im erforderlichen Verhältnis gebildet werden, oder ob die Bilanz nicht vollständig ausgeglichen ist, so daß in der Zelle ein Überschuß einzelner Komponenten vorliegt.

Unter diesen wählten wir für unsere Untersuchungen das ACP, das hierfür aus zwei Gründen geeignet war.

- Einerseits läßt sich dieses Protein durch Einbau radioaktiver Pantothensäure in die prosthetische Gruppe spezifisch markieren und durch Radioaktivitätsmessung einfach und empfindlich erfassen.
- Andererseits waren Acyl-Carrier-Proteine aus den fettsäuren-synthetisierenden Enzymsystemen verschiedener Herkunft, insbesondere aus E. coli, gut untersucht (59,60). Wie sich dabei gezeigt hatte, besitzen die verschiedenen ACP's über ihre funktionelle Homologie hinaus auch in ihren molekularen Eigenschaften weitgehende Ähnlichkeiten (näheres vgl. Kap. V). Insbesondere waren zwei Punkte für uns wesentlich.

a) Die Molekulargewichte dieser Proteinfamilie liegen durchweg in der Größenordnung von 10 000 Dalton. Ein in der Hefezelle etwa vorliegendes freies ACP sollte also ebenfalls ein in diesem Be-

reich liegendes Molekulargewicht besitzen.

b) Alle bisher isolierten AC-Proteine können E. coli-ACP bei der mit E. coli-Enzymen durchgeführten enzymatischen ACP-Bestimmung (Einzelheiten s. Kap. IV, 1) vertreten. Dies könnte auch bei einem freien ACP der Hefe zutreffen.

Diese beiden charakteristischen Eigenschaften benutzten wir als Richtschnur für die im folgenden beschriebene Suche nach einem freien ACP in der Hefezelle und forschten dementsprechend nach einem pantothensäure-haltigen Protein mit einem Molekulargewicht in der Größenordnung von 10 000 Dalton, das E. coli-ACP im enzymatischen Test vertreten kann.

## 2. Nachweis eines freien ACP in Hefe

Dazu wurde Hefe auf einem synthetischen Medium (61,62) unter Zusatz von radioaktiv markierter Pantothensäure aerob mit Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle bis zum Beginn der stationären Wachstumsphase gezüchtet (mit Hefezellen der späten logarithmischen Wachstumsphase wurden übereinstimmende Ergebnisse erhalten). Die geernteten Hefezellen wurden durch hochtouriges Schütteln mit Glasperlen (63) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei 144 000 g wurde ein partikelfreier Rohextrakt gewonnen. Als Referenzprotein für ein Molekulargewicht im Bereich von 10 000 Dalton setzten wir Cytochrom c (MG 13 000) zu und fraktionierten die Mischung anschließend nach Molekülgröße durch Gelfiltration an Sephadex G 75, das für globuläre Proteine einen Trennbereich zwischen 70 000 und 3 000 Dalton besitzt(64).

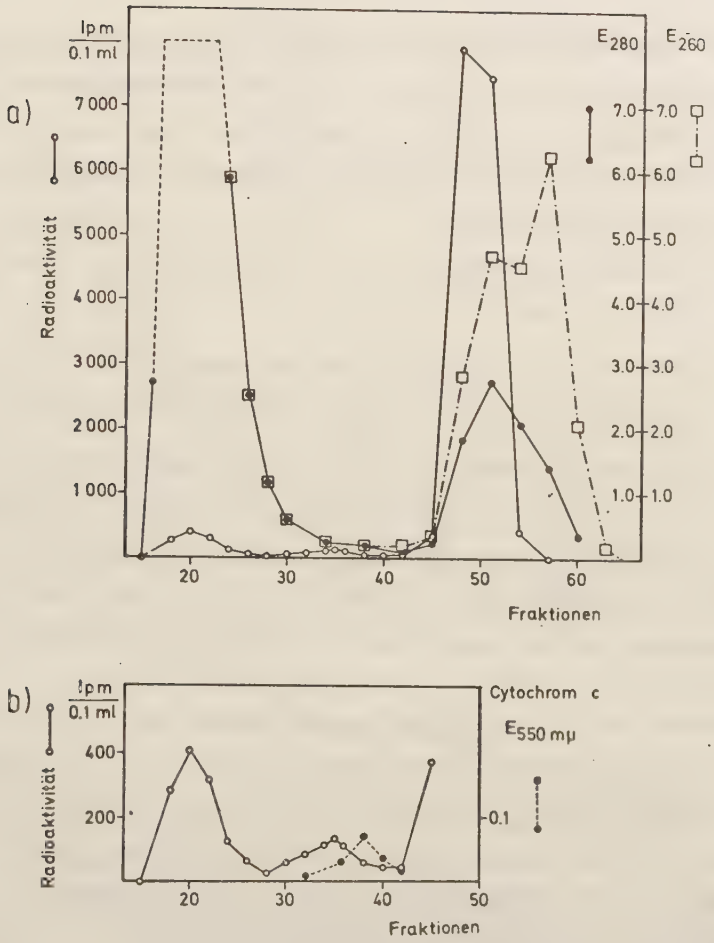



Abb. 6: Gelfiltration eines $^{14}$C-Pantothensäure markierten Heferohextrakts an Sephadex G 75

In a) sind der Radioaktivitätsgehalt sowie die Extinktionen bei 280 und 260 nm dargestellt; b) zeigt die Verteilung der Radioaktivität in vergrößertem Maßstab und die Elutionsposition des zugesetzten Cytochrom c.
Säule: 3,3 x 57 cm; Puffer: 0,02 M K-Phosphat, pH 6,2, 0,01 M Thioglycol, 1 mM EDTA; Fraktionsvolumen: 11,5 ml. Es wurden $3 \cdot 10^6$ Ipm) eines partikelfreien Heferohextrakts (1570 mg Protein; $5,3 \cdot 10^6$ Ipm), dem 6 mg Cytochrom c zugesetzt worden waren, aufgetragen. Einzelheiten der Hefezucht und des Aufschlusses (s. Exp. Teil, S. 114).

Abb. 6 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuchs. Es wurden 3 Radioaktivitätsgipfel gefunden, die sich folgendermaßen zuordnen lassen:

- FSS wandert im Ausschlußvolumen der Gelpackung und ist in den ersten Fraktionen enthalten;
- CoA bzw. dessen Abbauprodukte (14,15) sind in den letzten Fraktionen zu finden.

Diese beiden Gipfel enthielten zusammen mehr als 99 % der eingesetzten Radioaktivität. Sie wurden nicht weiter untersucht.

- In den mittleren Fraktionen ist weiteres pantothensäure-haltiges Material vorhanden, wie aus dem gefundenen Radioaktivitätsgehalt hervorgeht (Abb. 6, unterer Teil). Aus dem Vergleich seines Elutionsvolumens mit dem des zugesetzten Cytochrom c läßt sich ein Molekulargewicht von $k_n$app über 13 000 Dalton abschätzen.

Proteinfällung mit Trichloressigsäure zeigte, daß die Pantothensäure überwiegend (60-70 %) an Protein gebunden ist (das radioaktive Material der vereinigten, den mittleren Radioaktivitätsgipfel bildenden Fraktionen bestand aus mindestens zwei pantothensäurehaltigen Komponenten, wie hier nicht wiedergegebene Versuche zur Fraktionierung an Ionenaustauschern zeigten).

Nach dem Erhitzen auf 80° C für 5 min wurde die gesamte Radioaktivität in dem von ausgefallenem Protein befreiten Überstand gefunden; derartige Stabilität gegen Hitzedenaturierung ist eine weitere gemeinsame, wenngleich weniger spezifische Eigenschaft der bisher untersuchten AC-Proteine (65).

Der eindeutige Nachweis, daß im mittleren Radioaktivitätsgipfel der Gelfiltration ACP enthalten ist, gelang uns mit der enzymatischen ACP-Bestimmung: wie aus Abb. 7 ersichtlich, fanden wir eine von der eingesetzten Menge der Mittelfraktion linear abhängige ACP-Aktivität (vgl. IV, 1; S. 26 )

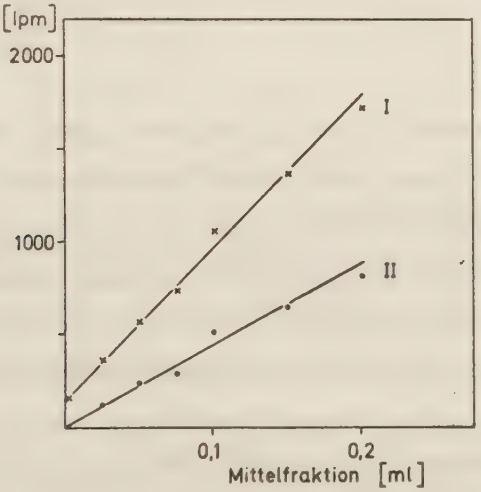



Abb. 7: Abhängigkeit der Malonyl-CoA-$^{14}CO_2$-Austauschreaktionen von den vereinigten, den mittleren Radioaktivitätsgipfel einer Gelchromatographie bildenden Fraktionen

Kurve I: gefundene Werte; Kurve II: Korrigierte Werte (nach Abzug der in der Mittelfraktion enthaltenen Radioaktivität und des durch Fraktion A (s. IV,1; S.27) verursachten Blindwerts). Die Ansätze enthielten im Volumen von 0,5 ml: 50 µMol Triäthanolamin·HCl/NaOH-Puffer, pH 7,5, 20 µMol Thioglycolat, 0,45 µMol Malonyl-CoA, 0,15 µMol Caproyl-CoA, 12 µMol $NaH^{14}CO_3$ ($7x10^4$ lpm/µMol), 1 mg Fraktion A und eingeengte Mittelfraktion. Inkubation: 1 h bei 30° C. Ausführung: s. Abb. 8 . Die angegebenen Werte beziehen sich auf den gesamten Ansatz.

Auf Grund dieser Befunde sehen wir es als erwiesen an, daß in der Hefe neben der im FSS-Komplex vorhandenen ACP-Funktion ein Protein mit den Eigenschaften eines ACP existiert.

Eine Diskussion über die Funktion dieses freien Hefe-ACP erfolgt in Kap. VIII.

## IV. REINIGUNG DES FREIEN ACP AUS HEFE

Nachdem wir den Nachweis für die Existenz eines freien ACP in Hefe erbracht hatten, war es unser Ziel, dieses Protein zu isolieren und zu charakterisieren. Im folgenden werden ACP-Test und ACP-Isolierung aus käuflicher Hefe beschrieben.

### 1. ACP-Test

Voraussetzung für die Isolierung eines bestimmten Proteins ist die Verfügbarkeit eines spezifischen Testverfahrens.

Der im Arbeitskreis von Vagelos (66) entwickelte Test für E. coli-ACP ist eine Substratbestimmung auf kinetischer Basis und setzt sich aus folgenden, reversiblen Reaktionen (Gleichung 3-5) zusammen. Die Summengleichung (Gleichung 6) veranschaulicht die Gesamtreaktion.

$$\text{ACP-SH} + {}^{-}O_2{}^{14}C\text{-}CH_2\text{-CO-SCoA} \rightleftharpoons {}^{-}O_2{}^{14}C\text{-}CH_2\text{-CO-S-ACP} + \text{CoA-SH} \quad (3)$$

$$\text{ACP-SH} + CH_3\text{-}(CH_2)_4\text{-CO-SCoA} \rightleftharpoons CH_3\text{-}(CH_2)_4\text{-CO-S-ACP} + \text{CoA-SH} \quad (4)$$

$$CH_3\text{-}(CH_2)_4\text{-CO-S-ACP} + {}^{-}O_2\text{-}{}^{14}CH_2\text{-CO-S-ACP} \rightleftharpoons$$
$$CH_3\text{-}(CH_2)_4\text{-CO-}CH_2\text{-CO-S-ACP} + {}^{14}CO_2 + \text{ACP-SH} \quad (5)$$

---

$$CH_3\text{-}(CH_2)_4\text{-CO-SCoA} + {}^{-}O_2{}^{14}C\text{-}CH_2\text{-CO-SCoA} + \text{ACP-SH} \rightleftharpoons$$
$$CH_3\text{-}(CH_2)_4\text{-CO-}CH_2\text{-CO-S-ACP} + {}^{14}CO_2 + 2\ \text{CoA-SH} \quad (6)$$

Ausgehend von Malonyl-CoA, Caproyl-CoA und $^{14}CO_2$ findet in Gegenwart der Enzyme Malonyl-CoA-ACP-Transacylase und ß-Ketoacyl-ACP-Synthetase ein ACP-abhängiger $CO_2$-Austausch an der freien Carboxylgruppe des Malonylrestes statt. Gemessen wird die in Malonyl-CoA eingebaute und daher säurestabile Radioaktivität.

Eine Aktivitätseinheit(E) ist definiert als diejenige Menge an ACP, die den Austausch von 1 µMol $CO_2$ pro Minute in Gegenwart überschüssiger Enzymfraktion A bei 30° C stimuliert.

Mit diesem Test wird spezifisch ACP erfaßt, da das die Kondensationsreaktion (Gleichung 5) katalysierende Enzym nur mit ACP-Derivaten reagiert (67).

Die Enzyme Malonyl-Transacylase und ß-Ketoacyl-Synthetase wurden durch fraktionierte Ammonsulfatfällung eines Rohextraktes aus E. coli gewonnen (68). Eine fast vollständige Abtrennung des noch enthaltenen E. coli-ACP gelingt durch Ionenaustausch-Chromatographie (69). Nach dieser zusätzlichen Reinigung war die Blindaktivität der als Fraktion A bezeichneten Enzymfraktion niedrig genug, um geringe ACP-Mengen noch eindeutig erfassen zu können.

Mit den folgenden Untersuchungen überprüften und bewiesen wir die Gültigkeit des Tests für ACP aus Hefe mit den Hilfsenzymen aus E.coli. Die ACP-Bestimmungen wurden in Anlehnung an die von Alberts et al. (70) beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

a) ACP-Abhängigkeit

Wie aus Abb. 8 ersichtlich ist, ist der Test bis zu 3 mE linear proportional der eingesetzten ACP-Menge bei einer Inkubationszeit von 30 min. (II), bei einer einstündigen Inkubation mindestens bis 1,5 mE(I).

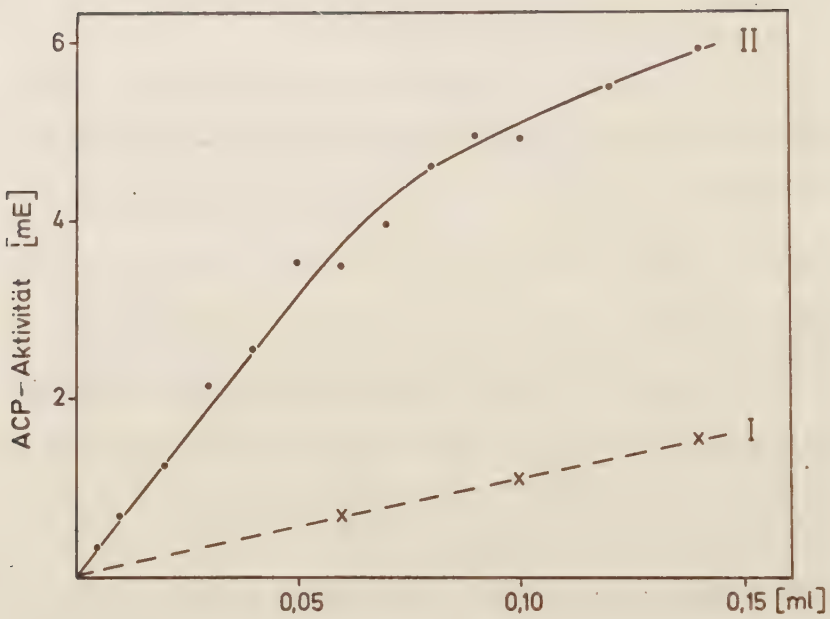



Abb. 8: ACP-Abhängigkeit mit verschiedenen ACP-Präparaten (I, II)
I : 0,2 mg/ml Protein
II: 0,14 mg/ml Protein

Die Testansätze enthielten jeweils im Volumen von 0,25 ml: 25 µMol K-Phosphat-Puffer, pH 6,8, 2,5 µMol DTT, 0,05 µMol Caproyl-CoA, 0,225 µMol Malonyl-CoA, 6,25 µMol $NaH^{14}CO_3$ ($117 \cdot 10^3$ Ipm/µMol), 2,75 mg Fraktion A und ACP.
Die aufgeführten Komponenten wurden im Eisbad zusammengegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von $NaHCO_3$ und Einsetzen in ein Wasserbad von 30° C gestartet. Nach 1 h (Kurve I) bzw. 30 min (Kurve II) wurde die Reaktion abgestoppt durch Einsetzen in ein Eisbad und Zugabe von 0,1 ml Eisessig. 0,2 ml wurden auf einen Filterpapierstreifen aufgetragen und nach dem Trocknen in Toluol-Szintillationsflüssigkeit gezählt.

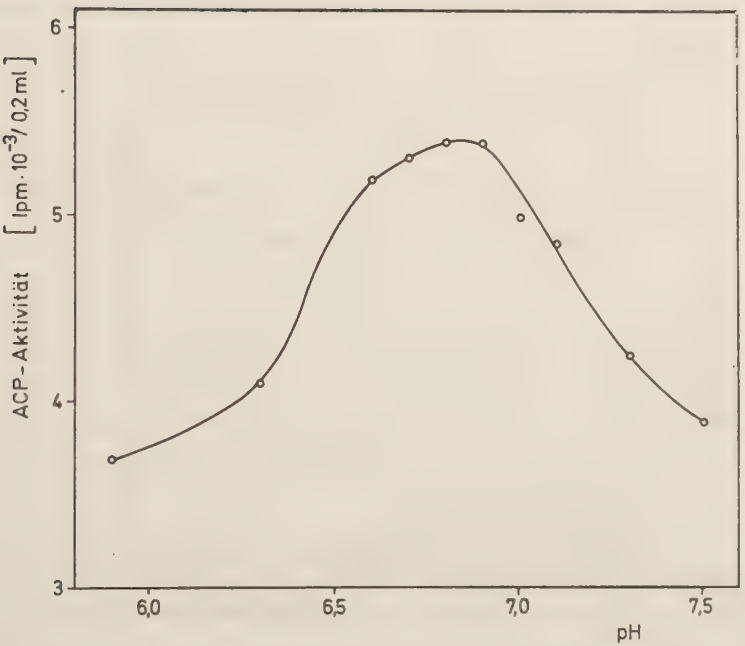



Abb. 9: pH-Abhängigkeit der ACP-Bestimmung

Die Ansätze enthielten jeweils 25 µMol K-Phosphat-Puffer des angegebenen pH-Wertes und konstante Mengen ACP. Inkubationszeit: 30 ' Testzusammensetzung und Ausführung: s. Legende zu Abb. 8.

b) pH-Abhängigkeit

In Abb. 9 ist die pH-Abhängigkeit des ACP-Tests wiedergegeben. Es ergaben sich keine Veränderungen, wenn der Phosphat-Puffer durch Imidazol- oder Triäthanolamin-Puffer ersetzt wurde.

Das pH-Optimum der Bestimmung liegt im Bereich von pH 6,7 - 6,9. Alle weiteren Bestimmungen wurden bei pH 6,8 durchgeführt.

Das mit Hefe-ACP gefundene pH-Optimum stimmt mit dem für E.coli-ACP erhaltenen Wert von pH 6,7 - 6,8 (71) überein, den wir bestätigen konnten.

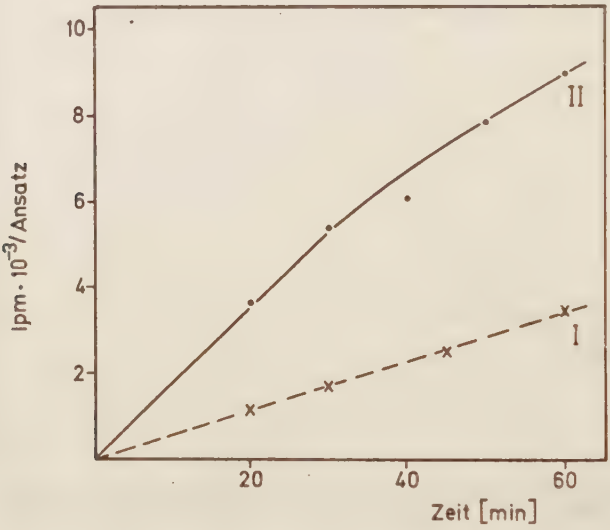



Abb. 10: Zeitabhängigkeit des ACP-Tests mit verschiedenen ACP-Mengen (I,II)
I: 5 µg; II: 43 µg
Inkubationszeit: wie angegeben. Zusammensetzung und Ausführung: s. Legende zu Abb. 8.

c) Zeitabhängigkeit

In Abb. 10 ist die Zeitabhängigkeit des $CO_2$-Malonyl-CoA-Austauschs wiedergegeben.

Je nach der gewählten ACP-Konzentration erhält man einen zeitlich linearen Verlauf bis zu 1 h (I) bzw. 30 min (II).

Die der ACP-Bestimmung zugrundeliegende Austauschreaktion zwischen $^{14}CO_2$ und Malonyl-CoA ist die Umkehrung des Kondensationsschrittes bei der FS-Biosynthese (72) und wird von der FSS ebenfalls katalysiert (73). Solange dieses Enzym anwesend ist, ist ein ACP-Test nicht möglich. In den meisten Fällen zerstörten wir die FSS durch Erhitzen und überprüften ihre Abwesenheit mit einem Testansatz ohne Fraktion A.

Unspezifischer Radioaktivitätseinbau wurde durch einen Testansatz ohne Malonyl-CoA erfaßt.

2. Anreicherung

a. Aufschluß

Käufliche Bäckerhefe wurde durch Rühren in Puffer suspendiert und durch Komprimieren und rasches Expandieren in einer Presse aufgeschlossen. Große Zellpartikel wurden durch Zentrifugation bei 3 000 g abgetrennt.

b. Hitzedenaturierung von Fremdproteinen

Proteine unterscheiden sich in ihrer Stabilität gegen Hitzedenaturierung. Bei der Anreicherung von Proteinen, die bei erhöhten Temperaturen stabil sind, ist eine selektive Denaturierung der hitzelabilen Begleitstoffe oft ein sehr wirksamer Reinigungsschritt.

Vorversuche mit zellfreiem Rohextrakt zeigten, daß Hefe-ACP unterhalb pH 7 bei 80° C noch stabil ist (Tab. 4). Daher versprach ein Hitzeschritt bei dieser Temperatur eine weitgehende Abtrennung der im Rohextrakt vorhandenen Proteine.

Tab. 4: Hitzestabilität des ACP

Je 200 ml Rohextrakt (24 mg/ml Protein) in 0,035 M K-Phosphat, 0,05 M NaCl, 0,05 M Thioglycol, pH 6,4, wurden innerhalb von ca. 10 min auf 80° C erhitzt und für die angegebene Zeit bei dieser Temperatur gehalten. Nach dem Abkühlen im Eisbad wurde denaturiertes Material durch Zentrifugation (45 min bei 3 000 g) entfernt. Die durch Lyophilisieren eingeengte Lösung wurde gegen 0,05 M K-Phosphat, 0,01 M Thioglycol, pH 6,8, unter Pufferwechsel 20 h dialysiert. Durch Zentrifugation (1 h bei 100 000 g) wurde eine klare Lösung erhalten. Bestimmung des ACP-Gehalts vgl. Legende zu Abb. 8.

| Zeit bei 80°C min | spez. Akt. [mE/mg] | Gesamt-Gehalt [mE] |
|---|---|---|
| 3 | 0,5 | 100 |
| 5 | 0,64 | 122 |
| 6 | 0,66 | 124 |
| 10 | 0,71 | 120 |

Da der ACP-Gehalt im untersuchten Zeitraum von der Dauer des Erhitzens unbeeinflußt blieb, konnte der Hitzeschritt mit vergrößertem Volumen (3,5 - 4 l) ausgeführt werden, wie es wegen der großen Mengen an Rohextrakt erforderlich war. Längeres Erhitzen, das zu einer etwas besseren Anreicherung führt, war durch die benötigte Zeit zum Erreichen von 80° dabei zwangsläufig gegeben; der zellfreie Rohextrakt wurde sodann noch 5 min bei dieser Temperatur gehalten.

Auf diese Weise wurden 97 - 98 % Protein abgetrennt, darunter auch die den ACP-Test störende FSS (vgl. Kap. IV,1c). Eine ACP-Bestimmung im klar zentrifugierten Überstand konnte wegen eines unspezifischen Radioaktivitätseinbaus, der den vom ACP verursachten erheblich überstieg, trotzdem nicht direkt durchgeführt werden.

Erst nach ausgiebiger Dialyse und Einengen (durch Gefriertrocknung) war die inkorporierte Radioaktivität spezifisch ACP-abhängig. Mit ACP-Präparaten dieser Reinigungsstufe war der Test jedoch nur bis ca. 0,15 mE angenähert linear proportional (vgl. Kap. IV, 1 a).

c. Fällung mit Säure und Ammonsulfat und selektive Extraktion

Zur Konzentrierung der beim Hitzeschritt erhaltenen verdünnten Lösung (ca. 1 mg/ml) brachten wir den pH-Wert auf pH 4, den isoelektrischen Punkt des ACP (s. Kap. V,1), und fällten das vorhandene Protein durch Zusatz von Ammonsulfat bis 95 % Sättigung aus. Nach der Zentrifugation fanden wir im Überstand keine ACP-Aktivität; das Sediment, suspendiert in Phosphat-Puffer, pH 7, und von denaturiertem Material befreit, war gegenüber der hitzestabilen Fraktion zwar nur 1,5-fach angereichert, aber - dies war sehr wesentlich - frei von den ACP-Test störenden Komponenten und konzentriert genug, um den Test durchführen zu können.

Vor den ACP-Gehaltsbestimmungen in Zellen und subzellulären Fraktionen mit dem Austauschtest wurden die Proben auf diese Weise von störenden Substanzen befreit (vgl. Kap. VI und VII).

Zur präparativen Isolierung des ACP schlugen wir einen anderen Weg ein. Versuche, durch Säurefällung in Abwesenheit von Ammonsulfat eine weitere Reinigung zu erzielen, erbrachten wegen einer Verteilung der ACP-Aktivität auf Niederschlag und Überstand unbefriedigende Ergebnisse. Sie zeigten aber, daß ACP überwiegend in Lösung bleibt. Das Löslichkeitsverhalten läßt sich eindeutig gestalten, wenn man umgekehrt verfährt und den durch Säure- und Ammonsulfatzugabe erhaltenen Niederschlag bei sauren pH-Werten extrahiert (Tab. 5, Ansätze 1-5).

ACP ließ sich im pH-Bereich seines isoelektrischen Punktes mit guten Ausbeuten eluieren. In den Rückständen, die zur Kontrolle anschließend jeweils in Puffer, pH 7, aufgenommen wurden, wurde nur wenig ACP-Aktivität (ca. 10 %) gefunden. Die Anreicherung war im Vergleich zum Referenzversuch - Extraktion bei pH 7 - zweifach (Tab. 5, Ansatz 1).

Versuche, mit dieser Methode eine höhere Trennschärfe durch Steigerung der Ionenstärke des Extraktionspuffers oder durch Erniedrigung des pH zu erreichen, schlugen fehl bzw. ergaben schlechte Ausbeuten. Dies war auch der Fall, wenn der Niederschlag sukzessiv mit Lösungen abnehmender Ammonsulfatkonzentration extrahiert wurde.

In einem weiteren Vorversuch mit größeren Mengen zeigte sich, daß das pH des Extraktionspuffers erhöht werden mußte, um geringe Ausbeuten und häufiges Eluieren zu vermeiden (Tab. 5, Ansatz 6). Unter den für große Ansätze gewählten Bedingungen (zweimalige Extraktion mit 0,1 M Na-Acetat, pH 4,6) entsprachen dann Ausbeute und Anreicherung den in den Vorversuchen ermittelten Werten (Einzelheiten s. Exp. Teil).

Durch Wiederholung der Ammonsulfatfällung bei pH 4 und Lösen des Niederschlags bei neutralem pH wurde die Proteinlösung konzentriert.

Versuche, ACP durch Fällung mit Perchlorsäure, die zur Konzentrierung des E. coli-ACP aus verdünnten Lösungen angewendet werden kann (74), und mit Aceton weiter anzureichern, erbrachten wegen schlechter Aktivitätsausbeuten keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

Tab. 5: pH-Abhängigkeit der Extraktionsausbeuten an ACP

Ansätze 1-5: diese Versuche wurden jeweils mit der gleichen "Stammlösung" durchgeführt: Bereitung des Rohextrakts und Durchführung des Hitzeschritts wie im exp. Teil (Anreicherungsvorschrift) beschrieben; jeweils 1 000 ml Überstand des Hitzeschrittes (3 mg/ml Protein) wurden bei pH 4 mit Ammonsulfat bis 45 % Sättigung versetzt, 3 h gerührt und dann 40 min bei 13 000 g zentrifugiert.
Ansatz 1: der durch Zentrifugation erhaltene Niederschlag wurde in 0,1 M K-Phosphat, pH 7, 0,01 M Thioglycol, homogenisiert, mit 0,5 N NaOH bei pH 7 gehalten und über Nacht gegen 0,05 M K-Phosphat, pH 7, 0,01 M Thioglycol, dialysiert; durch Zentrifugation (1 h bei 100 000 g) wurde eine klare Lösung erhalten.
Ansätze 2-5: der Niederschlag der Zentrifugation wurde zweimal beim angegebenen pH-Wert (0,2 M Na-Acetat) durch Plümpern und Rühren extrahiert (pH-Kontrolle durch Zugabe von NaOH) und dann 30 min bei 13 000 g zentrifugiert; die vereinigten Extrakte, die durch Lyophilisieren eingeengt und danach gegen 0,05 M K-Phosphat, pH 7,0, 0,01 M Thioglycol, dialysiert worden waren, wurden jeweils noch 1 h bei 100 000 g klar zentrifugiert. Die Rückstände der sauren Extraktion wurden jeweils entsprechend Ansatz 1 behandelt.
Ansatz 6 entspricht der Anreicherungsvorschrift (mit Ausnahme der Extraktion).

| Ansatz Nr. | Fraktion | spez. Akt. [mE/mg] | Gesamt-Akt. [mE] |
|---|---|---|---|
| 1 | pH 7-Extrakt | 0,75 | 1 260 |
| 2 | pH 3,8-Extrakt | 1,56 | 1 140 |
| | Rückstand (pH 7) | 0,15 | 110 |
| 3 | pH 4,0-Extrakt | 1,45 | 1 220 |
| | Rückstand (pH 7) | 0,13 | 100 |
| 4 | pH 4,2-Extrakt | 1,46 | 1 300 |
| | Rückstand (pH 7) | < 0,05 | < 30 |
| 5 | pH 4,4-Extrakt | 1,37 | 1 330 |
| | Rückstand (pH 7) | < 0,05 | < 30 |
| 6 | 1. Extr. pH 4,2 | 1,85 | 4 860 |
| | 2. Extr. pH 4,6 | 1,36 | 4 900 |
| | 3. Extr pH 7 | 0,08 | 480 |

Durch fraktionierte Ammonsulfat-Fällung zwischen 40 und 95 % Sättigung bei pH 4 ließ sich eine zweifache Anreicherung erzielen. Mit dem oben beschriebenen Verfahren der selektiven Elution wurde die gleiche Reinigung bei erheblich besseren Ausbeuten erreicht.

d. Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose

Als ein sehr wirksamer weiterer Reinigungsschritt des ACP erwies sich die Adsorption der gelösten Proteine bei niedriger Ionenstärke an einem Anionenaustauscher, gefolgt von einer selektiven Elution durch einen Salzgradienten.

Nach dem Auftragen der dialysierten und noch zusätzlich verdünnten Proteinlösung wurde der größte Teil der Fremdproteine durch ausgiebiges Nachwaschen der Säule zuerst mit Startpuffer, dann mit 0,15 M NaCl in Puffer abgetrennt. Die Elution der ACP-Aktivität erfolgte dann mit dem 2-3fachen Säulenvolumen an gepufferter 0,2 M NaCl; daran schloß sich ein sehr flacher, linearer Salzgradient von 0,2 - 0,3 M NaCl an. Dieser Teil der Chromatographie ist in Abb. 11 wiedergegeben.

Die Elution des ACP erfolgte bei einer NaCl-Konzentration zwischen 0,20 und 0,25 M. Nukleinsäuren blieben unter diesen Bedingungen am Austauscher gebunden und wurden so abgetrennt.
Die Elution der ACP-Aktivität kann auch ohne Gradienten durch 0,2 M NaCl erfolgen. Dazu sind allerdings 5-8 Säulenvolumen an Elutionsmittel erforderlich. Verläßlicher und bei großen Säulen zweckmäßiger ist aber das oben beschriebene Verfahren ohne Beeinträchtigung der Trennleistung, das deshalb angewandt wurde.

Die erhaltenen Präparate waren bei Ausbeuten zwischen 55 und 80 % 100-130-fach angereichert. Für eine Reinigung in diesem Ausmaß ist gründliches Auswaschen von Fremdprotein vor der Elution des ACP ausschlaggebend.

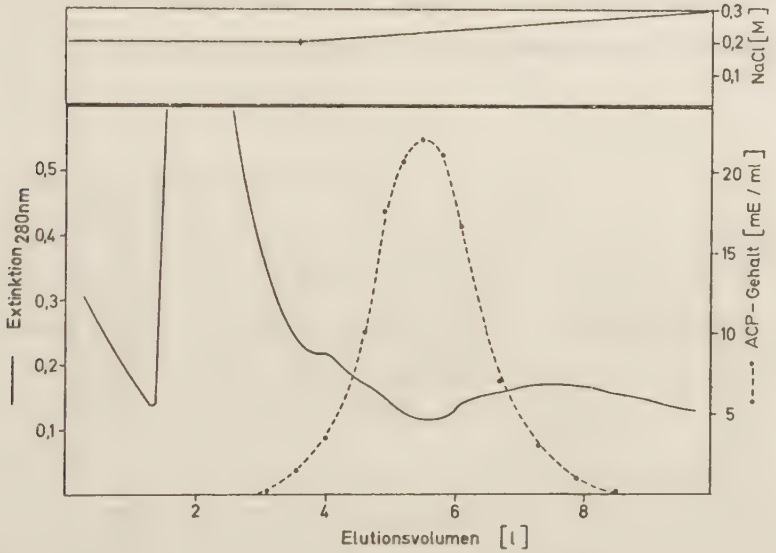



Abb. 11: Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose

Säule: 7,5 x 36 cm; Puffer: 0,01 M K-Phosphat, pH 6,0, 0,01 M Thioglycol. 26 g Protein (spez. Akt. 1,5 mE/mg) in 5 l Puffer wurden aufgetragen. Die Säule wurde anschließend zuerst mit 3,5 l Startpuffer, dann mit 0,15 M NaCl in Puffer nachgewaschen. Die Elution erfolgte mit 3,5 l 0,2 M NaCl, gefolgt von einem NaCl-Gradienten 0,2 - 0,3 M in 7 l Puffer.

e. Gelfiltration

Eine Trennung des Proteingemisches auf Grund unterschiedlicher Molekülgröße durch Chromatographie an Molekülsieben war mit den auf dieser Reinigungsstufe vorhandenen Proteinmengen einfach durchzuführen. Bei einem vermuteten Molekulargewicht von ca.

10 000 Dalton (vgl. Kap. III) war Sephadex G 75 der am besten geeignete Typ (64).

Für gute Trennergebnisse erwies es sich als notwendig, die Proteinlösung soweit einzuengen, daß das Auftragsvolumen 0,65 - 0,85 % des Gelbettvolumens betrug. Für eine scharfe Trennung ist eine hohe Ionenstärke in der Gelpackung erforderlich.

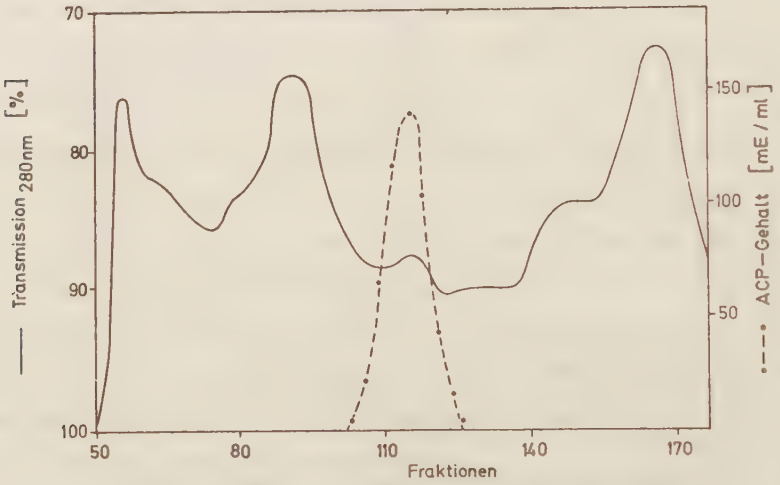



Abb. 12: Gelchromatographie an Sephadex G 75

Säule: 5 x 79 cm; Puffer: 0,02 M K-Phosphat, pH 6, 0,05 M NaCl, 0,01 M Thioglycol. 200 mg Protein (spez. Akt. 150 mE/mg) in 12 ml wurden durch Unterschichten aufgetragen. Es wurden Fraktionen mit 10 ml aufgefangen. Durchflußgeschwindigkeit: 80 ml/h.

Wie aus dem in Abb. 12 wiedergegebenen Elutionsdiagramm ersichtlich, ist ACP in den mittleren Fraktionen enthalten, gut getrennt von schneller wandernden, größeren als auch später eluierten, kleineren Substanzen.

Bei 70 - 80 % Ausbeute wurde eine 7-10-fache Anreicherung erzielt. Je nach Vereinigung der ACP-haltigen Fraktionen enthielten die Präparate noch 15 - 30 % Fremdprotein (4-6 schwache Begleitbanden in der Disk-Elektrophorese).

Die erhaltene, verdünnte Proteinlösung ließ sich am einfachsten durch Gefriertrocknung einengen.

f. Isoelektrische Fokussierung

Eine schnelle und einfache Methode zur Bestimmung des isoelektrischen Punkts (IP) von Proteinen ist die isoelektrische Fokussierung in einem pH-Gradienten (75). Dieses Verfahren ist auch zu präparativen Trennungen geringer Proteinmengen geeignet, wenn diese an ihren IP'en nicht denaturiert werden.

Ein stabiler, linearer pH-Gradient ist durch Elektrolyse einer Lösung von Ampholine (einem Gemisch aliphatischer Polyaminopolycarbonsäuren) in einem konvektionsfreien Medium leicht zu erhalten. Bei angelegtem elektrischen Feld konzentrieren sich amphotere Substanzen, wie z.B. Proteine, an der Stelle des durch den niedermolekularen Trägerampholyten gebildeten pH-Gradienten, der ihrem IP entspricht. Bei dieser Methode entstehen wegen der auftretenden hohen lokalen Proteinkonzentrationen häufig isoelektrische Proteinpräzipitationen, die die Trennleistung erheblich beeinträchtigen. Zur Erhöhung der Proteinlöslichkeit am IP setzten wir ein nichtionisches Detergenz zu (76) und konnten so diese Störung wirksam unterdrücken.

Wie das Elutionsdiagramm (Abb. 13) zeigt, wird ACP bei pH 4 konzentriert und anderes bei 280 nm absorbierendes Material abgetrennt.

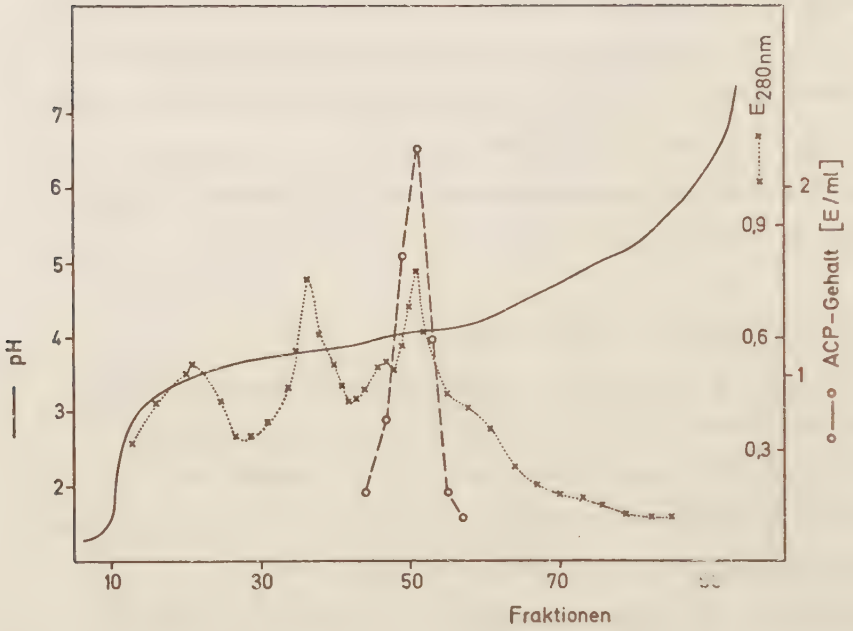



Abb. 13: Isoelektrische Fokussierung mit Ampholine pH 3-5
Protein: 16 mg (spez. Akt. 1,2 E/mg); Temp.: 4° C; Dauer: 43 h
Spannung: 700 V, Stromstärke: 2 mA (am Ende der Fokussierung);
Fraktionsvolumen: 1-1,5 ml

Saccharose und Ampholine wurden aus den vereinigten, ACP-haltigen Fraktionen durch Dialyse und - nach Einengen - durch Gelfiltration über Sephadex G 25 entfernt.

Wurden größere Mengen des so gereinigten ACP der Disk-Elektrophorese unterworfen, so waren nur noch 2 schwache Proteinbanden als Verunreinigungen sichtbar (Abb. 14).

Durch isoelektrische Fokussierung wurden die restlichen Verunreinigungen also fast vollständig abgetrennt. Präparate dieser Reinheit, deren spez. Aktivität 1,4 - 1,8 E/mg betrug, konnten

für die meisten Versuche verwendet werden.

g. Präparative Disk-Elektrophorese

Für einige Versuche benötigten wir ganz reines ACP. Die geringen, zur Verfügung stehenden Proteinmengen schränkten die zur Auswahl stehenden Methoden ein. Zur vollständigen Abtrennung der restlichen, geringfügigen Verunreinigungen kamen in erster Linie elektrophoretische Verfahren in Frage. Unter diesen wählten wir die präparative Disk-Elektrophorese, da die im analytischen Maßstab durchgeführten Elektrophoresen auf eine genügende Auftrennung hinwiesen. Auch die Elution der Substanzen vom Polyacrylamidgel erfolgte hierbei durch Elektrophorese: Die auf Grund ihrer unterschiedlichen Mobilität getrennten Komponenten wanderten bis zum unteren Ende des Trenngels und wurden dort bei ihrem Austritt von einem kontinuierlichen Pufferstrom erfaßt, der fraktioniert aufgefangen wurde.

Mit diesem Verfahren konnten die restlichen Verunreinigungen abgetrennt werden (Abb. 14). Die Ausbeute dieses Schrittes betrug zwar nur 55 %, dürfte aber bei Verwendung größerer Proteinmengen höher liegen. Wenn dies zutrifft, sollte die isoelektrische Fokussierung als Reinigungsschritt entbehrlich sein.

3. Reinheit

Zur Reinheitsprüfung biologischer Moleküle werden häufig elektrophoretische Verfahren verwendet. Unter ihnen zeichnet sich die Disk-Elektrophorese durch hohe Trennschärfe und große Empfindlichkeit aus. Eine einheitliche Wanderung in der Disk-Elektro-

phorese wird als Beweis sehr hoher Reinheit gewertet und ist allgemein als strenges Reinheitskriterium anerkannt.

Nach den beschriebenen Reinigungsschritten zeigte das isolierte ACP in der analytischen Disk-Elektrophorese in 12 %igem Polyacrylamidgel bei pH 9,5 und 8,0 (System 1 und 6 nach Maurer (77)) keine Verunreinigung durch Fremdproteine.

Abb. 14: Disk-Elektrophorese von ACP-Präparaten (densitometrische Auswertung nach Anfärben mit Coomassie brilliant blue G 250)
links: nach der isoelektrischen Fokussierung (50 µg)
rechts: nach der präparativen Disk-Elektrophorese (30 µg)

Abb. 14 zeigt eine densitometrische Auswertung eines Disk-Elektropherogramms von ACP-Präparaten nach der isoelektrischen Fokussierung (links) und nach der präparativen Disk-Elektrophorese (rechts).

Ebenfalls einheitlich verhielt sich mit Na-Dodecylsulfat (SDS) beladenes ACP bei der Elektrophorese in SDS-haltigem Acrylamidgel nach der Methode von Weber und Osborn (78), die Proteine nach Molekülgröße trennt (vgl. Kap. V, 3d).

## 4. Übersicht der Anreicherung

In Tab. 6 ist das Ergebnis der beschriebenen ACP-Isolierung zusammengefaßt. Bezogen auf die Aktivität der hitzestabilen Proteinfraktion war das ACP etwa 2 800-fach angereichert bei einer Ausbeute zwischen 20 und 40 %.

Tab. 6: Übersicht der ACP-Anreicherung aus 24 kg Hefe

| Reinigungsstufe | Protein [mg] | Gesamtakt. [E] | spez. Akt. [mE/mg] | Ausbeute [%] |
|---|---|---|---|---|
| Rohextrakt | $2{,}6 \cdot 10^6$ | -- | -- | -- |
| Hitzedenaturierung | 63 000 | 38 | 0,6 | 100 |
| Extraktion bei pH 4,6 der Säure-u, AS-Fällung | 26 000 | 39 | 1,5 | 102 |
| Ionenaustausch-Chromatographie | 200 | 30 | 150 | 79 |
| Gelfiltration an Sephadex G 75 | 15 | 21 | 1 380 | 55 |
| Isoelektrische Fokussierung | 9 | 15 | 1 700 | 40 |
| Präp. Disk-Elektrophorese | 5 | 8,5 | 1 700 | 22 |

Die durchgeführte Anreicherung berücksichtigte für Acyl-Carrier-Proteine typische Eigenschaften, eine für Proteine ungewöhnliche Stabilität gegenüber Hitze- und Säuredenaturierung, ein geringes Molekulargewicht in der Größenordnung von 10 000, ein im sauren pH-Bereich liegender isoelektrischer Punkt.

Die Reihenfolge der ersten Reinigungsschritte war durch das Bestreben bestimmt, bei der Isolierung möglichst bald den ACP-Test anwenden zu können und schnell auf ein kleineres, leichter zu handhabendes Volumen zu kommen. Dabei auftretende Schwierigkeiten waren hauptsächlich auf die geringe ACP-Konzentration in der Hefezelle zurückzuführen.

ACP-Präparate wurden in Lösung bei pH 6,5 mit Dithiothreit als SH-Schutzreagenz ohne Verlust der Aktivität bei -20° C eingefroren aufbewahrt. Die Anreicherung konnte so auch an jeder Stelle durch Einfrieren unterbrochen werden. Nach dem Auftauen evtl. entstandene Niederschläge, wie es zu Beginn der Reinigung der Fall sein konnte, führten zu keinen ACP-Verlusten und wurden durch Zentrifugation abgetrennt.

5. Anreicherung von $^{14}C$-Pantothensäure-haltigen ACP

Als Ausgangsmaterial für $^{14}C$-Pantothensäure-haltiges ACP benutzten wir die radioaktive Mittelfraktion mehrerer Gelfiltrationen (vgl. Kap. III. 2), die wir eingefroren aufbewahrten. Dieses vorgereinigte, radioaktiv markierte ACP wurde einem Anreicherungsansatz aus käuflicher Hefe vor der Ionenaustausch-Chromatographie zugesetzt und dann zusammen damit - wie beschrie-

[illegible] — die zur isoelektrischen Fokussierung weiter geeignet

Radioaktivität und MCP-Aktivität waren somit immer in der gle-

chen Fraktionen vorhanden.

Eine Reinigungsstufe des radioaktiven Präparats durch analytische

oder Elektrophorese ergab ein Ion in Form [illegible], wodurch

weitere Verfolgungen entsprechender Eig. wurde Radioaktivität

nur in der am schnellsten wandernden Hauptproteinbande gefun-

den war.

6. Isolierung der MCP aus E. coli.

Zu Vergleichszwecken wurde reines E. coli-MCP benötigt.

Die ersten drei Isolierungsschritte, die gleichzeitig der

Anreicherung der Fraktion 4 (vgl. Kap. IV. 5, Gleiten wurden nach

dem von Majerus et al. (68) beschriebenen Isolierungsverfah-

ren durchgeführt: Fällungen mit Streptomycinsulfat und Ammo-

niumsulfat zum Entfernen von Nukleinsäure und Protein; Darstellung

von DE - Extraktion des Niederschlags mit neutralem Puffer

Die weitere Reinigung wurde - in enger Anlehnung an das für Hefe

MCP ausgearbeitete Isolierungsverfahren - durch Gelfiltration,

isoelektrische Chromatographie und isoelektrische Fokussierung

durchgeführt. Dabei war E. coli-MCP frei von Verunreinigungen,

wie Disk-Elektrophoresen ergaben.

Die Abgrenzung der Isolierung aus Hefe veränderte Reinheitsgrade der

Reinigungsstufe war hier möglich und sinnvoll, da die E. coli-

MCP Präparate auf verschiedener Reinigungsstufe einen ca. gleich

starken Gehalt aufwiesen. Dadurch konnte die verbotene und gleich-

zeitig unbefriedigende Proteinmessung nach der Gelfiltration direkt

auf der Fraktionen gegeben werden.

Nach diesem Verfahren kann E. coli-ACP in kleinen Mengen gut rein dargestellt werden.

## V. MOLEKULARE EIGENSCHAFTEN DES ACP AUS HEFE

### 1. Isoelektrischer Punkt

Den scheinbaren isoelektrischen Punkt (IP) des Hefe-ACP bestimmten wir mit der Methode der isoelektrischen Fokussierung in Gegenwart eines nichtionischen Detergenz zu pH 4,15 bei 4° C (vgl. Kap. IV,2 f).

Der saure Charakter dieses Proteins, beruhend auf einem Überschuß der sauren Aminosäuren, wird durch das Ergebnis der Aminosäureanalyse bestätigt (vgl. Kap. V,2).

Zum Vergleich ermittelten wir unter gleichen Bedingungen den IP des ACP aus E.coli zu pH 3,8 bei 4°C. Auf Grund der Aminosäurezusammensetzung schätzten Vanaman et al. (79) einen Wert von pH 4,2. Die Differenz dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die durch die Faltung der Polypeptidkette veränderte nächste Umgebung der geladenen Aminosäuren ihre pK-Werte in rechnerisch nicht erfaßbarer Weise beeinflussen kann.

### 2. Aminosäurezusammensetzung

Für die Aminosäureanalyse wurde reines ACP verwendet. Die Bestimmung erfolgte nach salzsaurer Totalhydrolyse im Aminosäureanalysator nach Stein und Moore (80). Cysteamin wurde durch Perameisensäureoxidation (81) in Taurin überführt und als solches

bestimmt.

Tab. 7 (Spalte 1) zeigt die gefundenen Werte. Als Bestandteile der prosthetischen Gruppe wurden ß-Alanin und Cysteamin im erwarteten Verhältnis 1:1 gefunden. Cystein und Methionin sind am Aufbau der Peptidkette nicht beteiligt. Asparagin- und Glutaminsäure stellen zusammen 31 % aller Aminosäuren im Hefe-ACP dar und sind damit die am häufigsten vorkommenden Aminosäuren. Der hohe Gehalt an den sauren Aminosäuren im Vergleich zu den basischen steht in Übereinstimmung mit dem gefundenen isoelektrischen Punkt von pH 4,15 (vgl. Kap. V,1).

Zum Vergleich ist in Tab. 7 die Aminosäurezusammensetzung aus verschiedenen Organismen stammender Acyl-Carrier-Proteine aufgeführt. In der Aminosäurezusammensetzung weisen diese Proteine gleicher Funktion einige gemeinsame, charakteristische Merkmale auf, die in gleichem Maße auch auf das ACP aus Hefe zutreffen:

- Die sauren Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure sind am häufigsten vertreten und stellen etwa ein Drittel aller Aminosäuren dar (Ausnahme: ACP aus Euglena gracilis).
- Das Verhältnis der sauren zu den basischen Aminosäuren liegt zwischen 3 und 4 (Ausnahme: ACP aus Euglena gracilis).
- Ein Cysteinrest kommt im ACP-Molekül nicht vor (Ausnahme: ACP aus Avocado).

Tab. 7: Aminosäure-Zusammensetzung von ACP aus Hefe und anderen Organismen

| Aminosäure | Hefe | E.coli (59) | Mycobakterium phlei (23) | Arthrobakter viscosus (13) | Clostridium butyricum (9) | Avocado mesocarp(13) | Spinat (13) | Euglena gracilis(25) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cystein[1] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Cysteamin[2] | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| β-Alanin | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Asparagins.[3] | 25 | 9 | 11 | 14 | 13 | 12 | 12 | 7 |
| Threonin | 5 | 6 | 5 | 2 | 1 | 7 | 6 | 3 |
| Serin | 11 | 3 | 5 | 6 | 3 | 10 | 5 | 7 |
| Glutamins.[4] | 16 | 18 | 20 | 10 | 14 | 22 | 16 | 15 |
| Prolin | 3 | 1 | 4 | 1 | 1 | 3 | 2 | 3 |
| Glycin | 13 | 4 | 6 | 5 | 1 | 7 | 4 | 4 |
| Alanin | 10 | 7 | 13 | 12 | 6 | 11 | 9 | 9 |
| Valin | 12 | 7 | 8 | 6 | 7 | 10 | 7 | 6 |
| Methionin | 0 | 1 | 1 | 1 | 4 | 1 | 1 | 2 |
| Isoleucin | 10 | 7 | 6 | 6 | 8 | 5 | 5 | 8 |
| Leucin | 10 | 5 | 8 | 6 | 7 | 9 | 7 | 8 |
| Tyrosin | 1 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Phenylalanin | 4 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| Lysin | 8 | 4 | 5 | 5 | 4 | 10 | 9 | 7 |
| Histidin | 1-2 | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| Arginin | 3 | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |

[1] als Cysteinsäure nach Oxidation mit PAS bestimmt; [2] als Taurin nach Oxidation mit PAS bestimmt
[3] Asparaginsäure + Asparagin; [4] Glutaminsäure + Glutamin

3. Molekulargewichtsbestimmung

a) Molekulargewichtsberechnung

Das auf Grund der Aminosäure-Zusammensetzung (vgl. Kap. V,2) berechnete Minimalmolekulargewicht beträgt etwa 14 700 Dalton.

b) Thiolgruppen-Bestimmung

Da das Ergebnis der Aminosäureanalyse ferner zeigte, daß im ACP-Molekül nur eine Protein-Thiolgruppe (Cysteaminrest) vorhanden ist, war somit eine weitere Möglichkeit gegeben, das Minimal-molekulargewicht zu ermitteln.

Ellmans Reagenz (5,5'-Dithio-bis-nitrobenzoesäure; DTNB (83,84)) reagiert mit aliphatischen Thiolen stöchiometrisch und quantitativ unter Bildung eines gemischten Disulfids (Gleichung 7). Das gebildete Nitro-thiobenzoat-anion kann wegen seines hohen Extinktionskoeffizienten photometrisch gut bestimmt werden.

(7)

Zur SH-Bestimmung verwendeten wir reines ACP, das zuvor mit DTT bei schwach alkalischem pH reduziert und anschließend durch Gelfiltration über Sephadex G 25 von überschüssigem Reagenz befreit wurde.

Tab. 8 zeigt die Ergebnisse. Als Mittelwert bestimmten wir ein Molekulargewicht von 14 100 Dalton.

Tab. 8: Thiol-Bestimmung des ACP mit Ellmans Reagenz (DTNB)

| ACP [µg] | -SH [nMol] | Protein / -SH [g/Mol] |
|---|---|---|
| 38 | 2,41 | 15 770 |
| 50 | 3,53 | 14 160 |
| 76 | 5,26 | 14 450 |
| 95 | 6,69 | 14 200 |
| 126 | 10,5 | 12 000 |
| 132 | 9,4 | 14 040 |
| Mittelwert: | | 14 100 |

Durchführung s.S. 122

c) Bestimmung durch Chromatographie an Molekülsieben

Eine Standardmethode zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen ist die Chromatographie an Sephadexgelen (85). Wie schon erwähnt, werden dabei Proteine ihrer Molekülgröße entsprechend getrennt. Für globuläre Proteine besteht bei Säulenchromatographie eine angenähert lineare Beziehung des Elutionsvolumen ($V_E$) zum Logarithmus des Molekulargewichts. Mit geeigneten Eichproteinen läßt sich das Molekulargewicht aus dem Vergleich der leicht zu messenden Elutionsvolumina ermitteln.

Als Eichproteine dienten Serumalbumin (MG 67 000), Ovalbumin (MG 45 000), Chymotrypsinogen (MG 25 000) und Cytochrom c (MG 13 000). Abb. 15 (unterer Teil) zeigt das Elutionsdiagramm

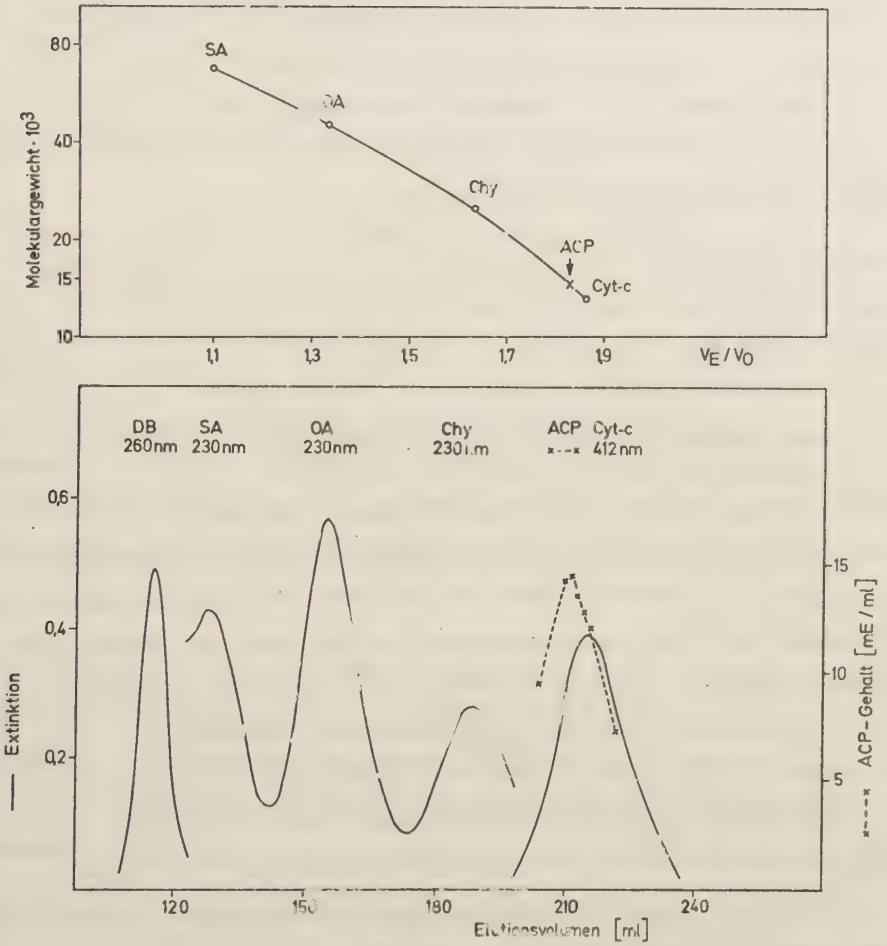



Abb. 15: Molekulargewichtsbestimmung durch Gelchromatographie an Sephadex G 75

oben: Auswertung des Elutionsdiagramms; unten: Elutionsdiagramm Säule: 2,5 x 57 cm, äquilibriert mit 0,05 M K-Phosphat, pH 6,5, 0,1 MNaCl; Durchflußgeschwindigkeit: 15 ml/h. Jeweils 2-2,5 mg folgender Eichsubstanzen wurden verwendet: Dextranblau (DB), Serumalbumin (SA), Ovalbumin(OA), Chymotrypsinogen (Chy), Cytochrom c (Cyt-c). ACP: 0,2 mg (spez. Akt. 1,3 E/mg).

einer Sephadex G 75-Chromatographie. Zur graphischen Auswertung (oberer Teil der Abb. 15) wurde das relative Elutionsvolumen ($V_E/V_O$) als von den Versuchsbedingungen unabhängiger Elutionsparameter aufgetragen. Das äußere Volumen ($V_O$) der Gelpackung wurde mit dem hochmolekularen Farbstoff Dextranblau bestimmt, der nicht in die Gelpackung eindringen kann.

Aus der graphischen Auswertung ergab sich ein Molekulargewicht von 14 000 Dalton. Den gleichen Wert erhielten wir auch mit RNase (MG 13 700) als kleinstem Eichprotein.

d) Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-Gelelektrophorese

Eine weitere, häufig angewandte Methode der Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen ist die Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von Natrium-dodecylsulfat (SDS) (86,78). Bei diesem Verfahren läßt sich das Molekulargewicht auf Grund der Wanderungsgeschwindigkeit, die dem Logarithmus des Molekulargewichts umgekehrt proportional ist, mit Hilfe geeigneter Eichproteine ermitteln. Allerdings ist ein "anormales" Verhalten bei der SDS-Elektrophorese von einigen Proteinen bekannt (87, 88). Während das ACP aus E. coli ein seinem Molekulargewicht von 8 700 Dalton entsprechendes Wanderungsverhalten zeigte, verhielt sich das ACP aus Hefe bei dieser Methode so, als ob es kleiner wäre als Cytochrom c und RNase. Bei der Sephadex-Gelchromatographie waren jedoch diese beiden Proteine später als das Hefe-ACP eluiert worden.

Die aus der Aminosäurezusammensetzung, Thiolgehalt und Gelchromatographie bestimmten Werte von 14 700, 14 100 und 14 000 stimmen gut überein. Wir messen ihnen deshalb höhere Aussagekraft bei als dem Ergebnis der SDS-Gelelektrophorese. Das ACP aus Hefe besitzt demnach ein Molekulargewicht von 14 000 Dalton.

4. Nachweis von Serin als Bindungsstelle der prosthetischen Gruppe

Durch den Einbau von radioaktiver Pantothensäure und die Aminosäureanalyse (vgl. Kap. III,2 und IV,5 bzw. V,2) war Pantethein als prosthetische Gruppe des Hefe-ACP sichergestellt. Es war anzunehmen, daß auch beim freien Hefe-ACP Pantethein durch eine Phosphodiesterbindung über einen Serinrest mit der Peptidkette verknüpft ist, wie es bei den Acyl-Carrier-Proteinen anderer Herkunft der Fall ist.

In diesem Fall sollte bei einer Alkalibehandlung die prosthetische Gruppe unter milden Bedingungen eliminiert werden (vgl. Kap. II,3). Hierbei entsteht aus dem Serinrest Dehydroalanin, das bei der Hydrolyse der Peptidbindungen in Pyruvat und Ammoniak übergeht.

Tatsächlich enthielt nach Alkali-Behandlung von im ß-Alaninrest radioaktiv markiertem ACP (vgl. Kap. IV, 5) der mit Trichloressigsäure gefällte Proteinniederschlag keine Radioaktivität mehr.

In einer weiteren ACP-Probe, die anschließend an die alkalische Phosphopantethein-Eliminierung der salzsauren Hydrolyse unterworfen wurde, konnten wir Pyruvat nach Überführung in sein 2,4-

Dinitrophenylhydrazon durch papierchromatographischen Vergleich mit der authentischen Substanz nachweisen (38). Auf Grund der Abwesenheit des 2,4-Dinitrophenylhydrazons von $\alpha$-Ketobutyrat ist eine Bindung der prothetischen Gruppe an Threonin ausgeschlossen.

Auf Grund dieser Ergebnisse sehen wir es als gesichert an, daß Phosphopantethein als prosthetische Gruppe durch eine Esterbindung an einen Serinrest mit dem Protein verknüpft ist.

5. Coenzymaktivität des ACP

Die Coenzymaktivität des Hefe-ACP im fettsäure-synthetisierenden Enzymsystem aus E. coli - mit Hilfe des $CO_2$/Malonyl-CoA-Austauschs gemessen - beträgt zwischen 1,4 und 1,8 E/mg und ist somit etwa ein Drittel so groß wie der für E. coli-ACP angegebene Wert (2,4 - 6,9 E/mg (70,89)).

Diese erstaunlich hohe Aktivität läßt auf eine weitgehende strukturelle Ähnlichkeit mit dem ACP aus E. coli in denjenigen Teilbereichen schließen, die an der Wechselwirkung mit dem Enzym ß-Ketoacyl-ACP-Synthetase beteiligt sind. Die Raumstruktur des E. coli-ACP ist noch nicht bekannt, jedoch haben chemische Modifizierungsexperimente interessante Hinweise auf Struktur-Aktivitätsbeziehungen geliefert (89-91): Modifikationen der Seitenketten von Lys-, Met- und Tyr-Resten rufen zwar teilweise erhebliche Strukturänderungen hervor, haben aber auf die Aktivität in den Austauschreaktionen keinen oder nur geringfügigen Einfluß. Die Carboxylgruppen andrerseits sind von entscheidender Bedeutung für die biologische Funktion: Eine Amidierung von 2-3 Carboxyl-

resten führt zu einem vollständigen Funktionsverlust bei nur geringen Strukturänderungen.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß die Aktivität der Acyl-Carrier-Proteine aus Avocado (13) und Spinat (13) sowie Euglena gracilis (25) im Vergleich zu E. coli-ACP um den Faktor 10 bzw. 100 geringer ist. Die in der Literatur aufgeführten spezifischen Aktivitäten können allerdings nur Grundlage eines überschlagsmäßigen Vergleichs sein, da Testbedingungen (pH, SH-Schutzreagenz) in keinem Fall identisch waren.

## VI. INTRAZELLULÄRE LOKALISIERUNG DES ACP IN HEFE

Einen Hinweis auf die Funktion des freien ACP erwarteten wir von dessen intrazellulären Lokalisierung.

### 1. Hefesphäroplasten und Aufschluß

Um eine aussagekräftige intrazelluläre Lokalisierung vornehmen zu können, ist ein schonender Aufschluß Voraussetzung, bei dem die subzellulären Strukturen nicht bzw. möglichst wenig beschädigt werden. Bei Organismen mit einer festen Zellwand, wie z.B. bei Hefen, sind Protoplasten und Sphäroplasten das geeignete Ausgangsmaterial. In dieser Form besitzen sie keine zusammenhängende, stabilisierende Zellwand mehr und können unter den erforderlichen, milden Bedingungen aufgebrochen werden.

Hefesphäroplasten gewinnt man mit dem "Helicase" genannten Enzymgemisch aus dem Magen-Darm-Trakt von Weinbergschnecken, das die Zellwand von vielen Hefestämmen abbaut (92). Wir verwendeten Hefezellen des Stammes S. carlsbergensis, die wir aerob bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase züchteten. In Anlehnung an in der Literatur beschriebene Methoden (93,94), die auf die Untersuchungen von Duell et al. (95) zurückgehen, wurden Hefesphäroplasten dargestellt: Zuerst wurden Disulfidbindungen der am Zellwandaufbau beteiligten Proteine mit Thioglycol unter Zugabe von EDTA reduziert. Danach erfolgte der enzymatische Zellwandabbau mit Helicase in 0,8 M Mannit, das zur Stabilisierung der osmotisch labilen Sphäroplasten dient.

Die Spharoplastenbildung ließ sich durch vergleichende Trübungsmessungen einer isoton und einer hypoton verdünnten Probe einfach und schnell verfolgen (93,96). In einem hypotonen Medium werden die Spharoplasten durch den intrazellularen, osmotischen Druck zum Platzen gebracht. Die Lyse führt deshalb gegenüber der isoton verdünnten Probe zu einer verminderten Trübung (Abb. 16).

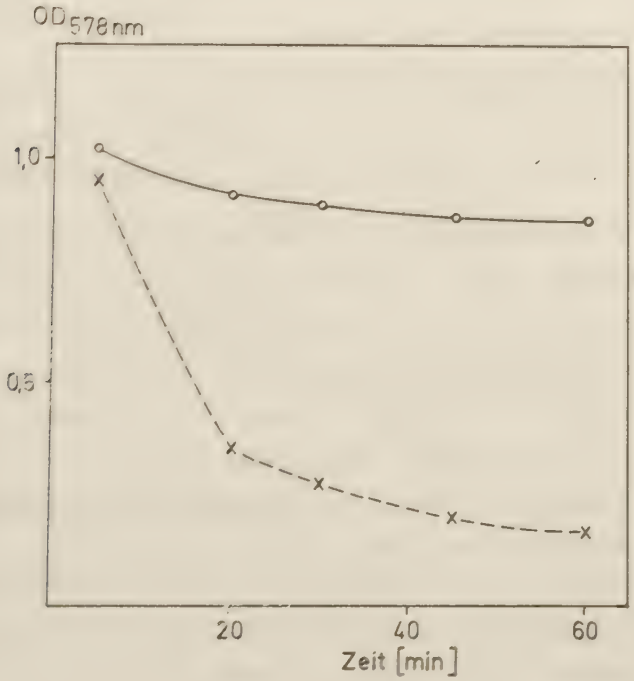



Abb. 16: Hefesphäroplasten-Bildung mit "Helicase"

Zu den angegebenen Zeiten wurden der Inkubationsmischung Proben entnommen und zur Trübungsmessung 1:30 verdünnt

-o--o-: isoton mit 0,6 M Mannit; -x--x-: hypoton mit Wasser

Der Aufschluß erfolgte in Anlehnung an eine von Kovac et al. (97) für die Mitochondrienisolierung benutzte Methode: Die gewaschenen Sphäroplasten wurden durch Homogenisieren nach Potter-Elvehjem (98) aufgebrochen. Da der Aufschlußpuffer eine geringere Osmolarität als die zum Waschen der Zellen benutzten Lösungen besaß, wurde der mechanische Aufschluß von einem osmotischen Schock unterstützt (Einzelheiten s. Exp. Teil).

## 2. Fraktionierung des Zellinhalts

Die subzellulären Strukturen unterscheiden sich in ihrem Sedimentationsverhalten und können durch differentielle Zentrifugation in verschiedenen Sedimenten angereichert gewonnen werden.

Wir führten die Trennung der aufgeschlossenen Hefespäroplasten entsprechend dem in Abb. 17 wiedergegebenen Schema durch. Den 4 klassischen Zellfraktionen wurde eine weitere, als "submitochondriale Partikelfraktion" bezeichnete hinzugefügt. Zellkerne und Mitochondrien, die sich in ihren Sedimentationsbedingungen erheblich überschneiden (99), wurden durch Wiederholung der fraktionierten Zentrifugation bei den angegebenen Bedingungen gewaschen (Einzelheiten s. Exp. Teil).

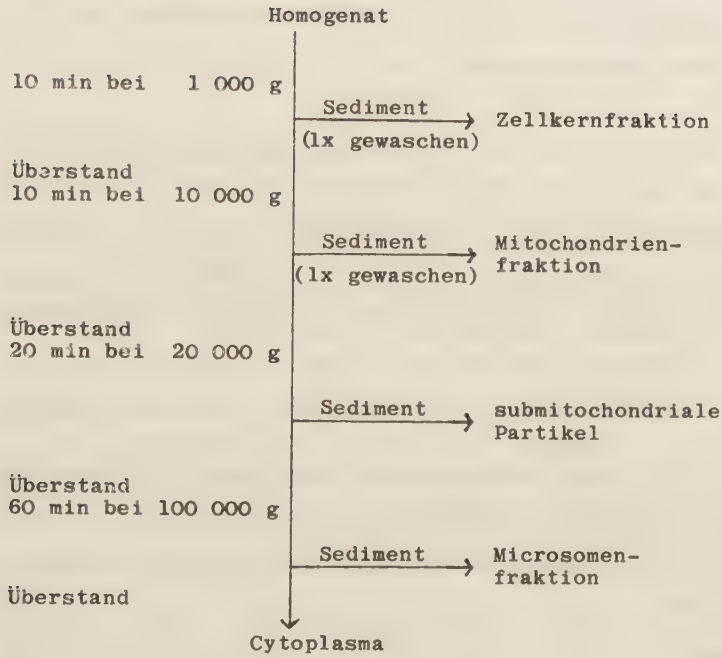



Abb. 17: Schema der fraktionierten Zentrifugation

## 3. Ergebnis

In den gewonnenen Fraktionen und in einem Aliquot des Homogenats wurde mit dem Austauschtest der ACP-Gehalt gemessen (vgl. Kap. IV,1). Parallel dazu bestimmten wir die Enzymaktivitäten zweier ausschließlich in Mitochondrien angesiedelter Proteine (100), Citrat-Syntase (CS) und Cytochrom c-Oxidase (Cyt. c-O).

In Tab. 9 sind Aktivitätsverteilung und spezifische Aktivität des ACP (als Coenzym) und der beiden mitochondrialen Leitenzyme nebeneinandergestellt.

Tab. 9: Verteilung von ACP, Citrat-Synthase und Cytochrom c-Oxidase auf die subzellulären Fraktionen

115 ml Homogenat aus 26 g Hefesphäroplasten mit 15.7 mg/ml Protein; ACP: 0,072 mE/mg, Ausbeute: 125 %; CS: 0,51 U/mg, Ausbeute: 93 %; Cytochrom C-Oxidase: 0,11 µMol $O_2$/min/mg, Ausbeute: 70 %. Wegen der unterschiedlichen Ausbeuten sind die Werte in Tab. 9 zum besseren Vergleich auf die Summe der in den subzellulären Fraktionen gefundenen Aktivitäten bezogen.

| Fraktion | Protein | Aktivität % | | | relative spez. Akt. | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | mg | ACP | CS | Cyt.c-Ox. | ACP | CS | Cyt.c-Ox. |
| Zellkerne | 392 | 36 | 39 | 26 | 2,1 | 2,5 | 1,3 |
| Mitochondrien | 134 | 46 | 46 | 70 | 8 | 8,8 | 10 |
| submitochondr. Partikel | 93 | 15 | 13 | 14 | 4 | 3,5 | 3 |
| Microsomen | 169 | <1 | <1 | <1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |
| Cytoplasma | 1070 | 2 | 2 | <1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |

Von den 5 Zellfraktionen enthielt die Mitochondrienfraktion mit 46 % den größten Teil des ACP; die restliche ACP-Aktivität wurde fast vollständig in den Fraktionen gefunden, die von der Aufarbeitung her gesehen der Mitochondrienfraktion benachbart sind und folglich mitochondriales Material als Verunreinigung enthalten können.

Die Zellkernfraktion ist als erstes Sediment der Fraktionierung noch recht heterogen zusammengesetzt und enthält zum einen noch unaufgeschlossene Zellen, zum anderen Mitochondrien, die teil-

weise mitsedimentiert werden (99). Auf diese Verunreinigungen kann der verhältnismässig hohe gefundene ACP-Gehalt von 36 % in der Zellkernfraktion zurückgeführt werden.

Die submitochondriale Partikelfraktion andererseits besteht zu einem erheblichen Teil aus Material mitochondrialen Ursprungs, das sich wegen der angewendeten, verschärften Sedimentationsbedingungen wahrscheinlich vorwiegend aus kleinen und teilweise beschädigten Mitochondrien zusammensetzt. Daraus kann geschlossen werden, daß der ACP-Gehalt dieser Fraktion ebenfalls mitochondrialer Herkunft sein dürfte.

Microsomen und Cytoplasma enthielten äußerst wenig ACP, vorausgesetzt, daß, wie in diesem Bespiel, die Mitochondrien beim Aufschluß und während der weiteren Aufarbeitung nicht beschädigt wurden.

Für die mitochondrialen Leitenzyme Citrat-Synthase und Cytochrom c-Oxidase wurde eine übereinstimmende Aktivitätsverteilung gefunden wie für das ACP.

Wir betrachten deshalb unser Ergebnis als klaren Beweis für die Lokalisierung des freien Hefe-ACP in den Mitochondrien.
Aus diesem Grund kann auch die Möglichkeit, daß das freie ACP der Hefe durch einen proteolytischen Prozeß der FSS entstammt, eindeutig ausgeschlossen werden: In diesem Fall hätte ACP im Cytoplasma gefunden werden müssen, da die FSS nach Untersuchungen von Pirson et al. (96) im cytoplasmatischen Raum lokalisiert ist.

4. ACP-Gehalt in Hefe unter verschiedenen Zuchtbedingungen

Durch eine Reihe von Faktoren kann in einigen Mikroorganismen die Bildung von Mitochondrien hinsichtlich ihrer Struktur und Anzahl beeinflußt werden (101, 102). So kann etwa die Bildung strukturell gut entwickelter Mitochondrien in Hefe durch Züchten unter anaeroben Bedingungen unterdrückt werden. Einen ähnlichen Effekt bewirken hohe Glucosekonzentrationen ("Glucose-Repression" oder allgemeiner "katabolische Repression").

Es war von Interesse zu untersuchen, welche Auswirkungen diese Variationen auf den ACP-Gehalt haben.
Der jeweils gefundene ACP-Gehalt ist zusammen mit den wichtigsten Wachstumsbedingungen in Tab. 10 zusammengestellt.

Der höchste ACP-Gehalt wurde erwartungsgemäß unter den Bedingungen gefunden, die für die Mitochondrienentwicklung sehr günstig sein sollten (Ansatz 1).

Erhöhung der Glucosekonzentration führt zu einem Absinken des gemessenen ACP-Gehalts nur um ca. 30 % (Ansatz 2-4). Dies ist überraschend, da unter vergleichbaren Bedingungen für andere Enzyme weitaus stärkeres Absinken nachgewiesen wurde (102, 104). Zusätzlicher Sauerstoffentzug - auch in Gegenwart von Ergosterol und Tween als Quelle für ungesättigte Fettsäuren (105) - bewirkt keine signifikante Änderung (Ansatz 4).

Ergosterol und ungesättigte Fettsäuren müssen unter anaeroben Bedingungen dem Medium zugefügt werden, um ein gutes Wachstum zu erzielen (106,107). Auch unter diesen Bedingungen sind in der Hefe Mitochondrien-ähnliche Gebilde (Promitochondrien) vorhanden (108).

Bemerkenswert ist, daß Zusatz von Chloramphenicol keine zusätzliche Erniedrigung des ACP zur Folge hat (Ansatz 5). Chloramphenicol ist ein Hemmstoff der prokaryotischen und mitochondrialen Proteinbiosynthese. Wir folgern daher, daß die Biosynthese von ACP nicht im mitochondrialen System der Proteinbiosynthese erfolgt, sondern vielmehr an den cytoplasmatischen Ribosomen gebildet und nachträglich in die Mitochondrien eingeschleust wird.

Tab. 10: ACP-Gehalt unter verschiedenen, die Mitochondrienentwicklung beeinflussenden Zuchtbedingungen in Hefe

| Ansatz | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| Sauerstoff | aerob | aerob | aerob | anaerob | aerob |
| Glucose (%) | 1 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Ergosterol (mg/l) | - | - | 20 | 20 | - |
| Tween 80 (g/l) | - | - | 5 | 5 | - |
| Chloramphenicol (g/l) | - | - | - | - | 1 |
| ACP-Gehalt (mE/g Hefe) | 4,4 | 3,1 | 3,2 | 2,8 | 2,9 |

## VII. VERSUCHE ZUR FUNKTION DES FREIEN ACP IN DER HEFE

### 1. Vorbemerkung

Mitochondrien, ebenso wie Plastiden, nehmen unter den cytoplasmatischen Zellorganellen eine Sonderstellung ein und besitzen aus genetischer Sicht eine rudimentäre Autonomie (109). Eine Reihe mitochondrialer Komponenten weist in ihren Eigenschaften eine so ausgeprägte Ähnlichkeit mit den entsprechenden prokaryotischen Systemen auf, daß über den evolutionären Ursprung der Mitochondrien die Endosymbiontenhypothese (in Symbiose mit der Zelle lebende Bakterien als Ursprung der Mitochondrien) diskutiert wird.

Als ein in unserem Zusammenhang bedeutsames Beispiel sei erwähnt, daß die FSS aus pflanzlichen Zellen in den Chloroplasten lokalisiert ist und aus einzelnen Proteinen besteht (110-113). In ihren molekularen Eigenschaften gleicht sie somit den entsprechenden Enzymsystemen aus Prokaryonten.

Auf Grund der Lokalisierung des freien Hefe-ACP in den Mitochondrien konnte sicher angenommen werden, daß das Protein an dort ablaufenden Prozessen beteiligt ist. Sehr naheliegend erschien uns hierbei die Annahme, daß Hefe außer der FSS des Cytoplasmas in den Mitochondrien ein weiteres Enzymsystem enthält, das in der Lage ist, Fettsäuren entweder de novo zu synthetisieren oder zu verlängern. In einem solchen Fall könnte ACP eine Komponente dieses vermuteten, womöglich aus einzelnen Proteinen aufgebauten Enzymsystems sein.

Die Coenzymaktivität des Hefe-ACP im fettsäure-synthetisierenden Enzymsystem aus E. coli stützten unsere Arbeitshypothese.

## 2. Isolierung und Reinigung von Mitochondrien aus Hefe

Mitochondrien wurden durch fraktionierte Zentrifugation eines Homogenats aus Hefesphäroplasten gewonnen, wie in Kap. VI, 1 + 2 schon beschrieben.

Zur weiteren Reinigung wurde die so erhaltene, rohe Mitochondrienfraktion im Saccharosedichtegradienten (30-50 % g/g) zentrifugiert. Die Mitochondrien bildeten hierbei eine ausgeprägte Bande in der Mitte des Gradienten am Ort ihrer Schwebedichte (1,18 g/ml). Im oberen Drittel befanden sich noch vorhandene, langsamer sedimentierende Bestandteile des Zellinhalts; am Boden des Zentrifugenröhrchens waren als kompakter Niederschlag Zellkerne zu finden. Nach Fraktionierung des Gradienten und Verdünnen der Mitochondrienfraktion mit isotoner Saccharoselösung wurden die Mitochondrien durch nochmalige Zentrifugation bei niedrigen g-Zahlen als Sediment erhalten.

Um die Reinheit der auf diese Weise erhaltenen Präparate zu überprüfen, wurden sie mit dem Elektronenmikroskop untersucht[1]. Nach diesen Aufnahmen zeigten die Mitochondrien keine Verunreinigungen durch Zellkerne oder Membranbestandteile. Auf die vollständige Abwesenheit cytoplasmatischer Komponenten, insbesondere des FSS-Komplexes, wird später ausführlich eingegangen (vgl. Kap. VII,4).

---

1) Herrn Dr. E. Siess, Inst. f. Diabetesforschung, München, möchte ich an dieser Stelle für die elektronenoptischen Aufnahmen und Diskussion der Bilder sehr herzlich danken.

Mitochondrien bestehen aus zwei Membransystemen, die somit zwei Kompartimente begrenzen, das innere (Matrix) und das äußere (Raum zwischen den Membranen). Innere Membran und Matrix enthalten die für die Energiegewinnung wichtigen Funktionen. Während die äußere Membran für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von etwa 10 000 Dalton durchlässig ist, stellt die innere Membran die Diffusionsbarriere dar (114-115). Beim Arbeiten mit intakten Mitochondrien ist wegen der Diffusionssperre für Substrate eine Latenz von Enzymaktivitäten zu beobachten ( 116 ). Um Einflüsse dieser Art auszuschließen, führten wir die im folgenden beschriebenen Versuche alle mit aufgebrochenen bzw. subfraktionierten Mitochondrien durch.

Durch ausgiebiges mechanisches Homogenisieren in einem hypotonen Medium in Gegenwart von Phosphat und EDTA (vgl. unten) wurden Mitochondrien aufgeschlossen (= Homogenat). Nach einer Zentrifugation befanden sich im Überstand die löslichen Komponenten (= Extrakt).

Zur Trennung der inneren und äußeren Mitochondrienmembran wurden nur wenige Methoden beschrieben (117-119). Das von Sottocasa et al. (120) für Leber-Mitochondrien entwickelte Verfahren beruht auf einem Schwellen der inneren Membran durch Phosphat und EDTA in einem hypotonen Medium, das zu Brüchen der äußeren Membran führt, und einer anschließenden, selektiven Kontraktion der inneren Membran durch ATP und $Mg^{++}$ in einem hypertonen Medium; eine vorsichtige Behandlung mit Ultraschall dient einer vollständigeren Ablösung von Fragmenten der äußeren Membran. Durch Zentrifugation im Dichtegradienten lassen sich dann Fraktionen erhalten, die vorwiegend a) innere Membran und Matrix, b) äußere

Membran und c) Komponenten des äußeren Kompartiments enthalten.

Ausgehend von der (nicht zutreffenden) Annahme, daß diese Methode auch für Hefe-Mitochondrien anwendbar sei, führten wir einen Teil der im folgenden beschriebenen Versuche mit nach diesem Verfahren fraktionierten Mitochondrien durch.

### 3. Nachweis einer Malonyl-CoA-abhängigen Fettsäuresynthese in Mitochondrien aus Hefe

Über eine Fettsäuresynthese in Hefe-Mitochondrien lagen bisher keine Untersuchungen vor. Für ihren Ablauf sind mehrere Möglichkeiten denkbar, die sich in folgenden Punkten unterscheiden lassen:

- Zum Start der Synthese notwendiger Acylrest: de novo-Synthese mit Acetyl-CoA als "Starter" oder Kettenverlängerung eines Acylrestes um eine oder mehrere $C_2$-Einheiten;
- Mechanismus der Kondensationsreaktion: Die Bildung eines ß-Ketoacylrestes könnte durch Kondensation eines Acetyl- bzw. Acylrestes (gesättigt oder ungesättigt) mit einem Malonyl- oder einem Acetylrest erfolgen.

Zum Nachweis einer m-FS-Synthese benützten wir den radiochemischen Enzymtest nach Lynen (121). Bei diesem sehr empfindlichen Verfahren wird die aus radioaktiv markierten Vorstufen in die petrolätherlösliche Fettsäurefraktion inkorporierte Radioaktivität bestimmt. Sie dient als Maß der Enzymaktivität. Um die Oxidation der im Test als Substrate eingesetzten reduzierten Pyridinnukleotide zu verhindern, wurden die Inkubationsansätze

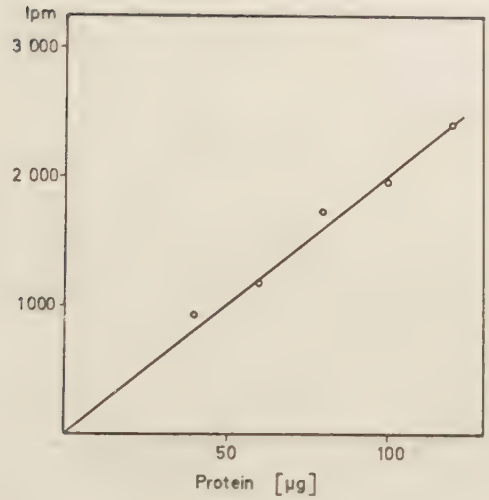
anaerob in Gegenwart von Rotenon, einem Hemmstoff der Atmungskette, durchgeführt. Hier schon soll daraufhingewiesen werden, daß alle Aktivitätsteste der m-FS-Synthese ohne ACP-Zusatz durchgeführt werden konnten (vgl. Kap. VII,6).

a) Unsere ersten Versuche galten der Frage nach dem Vorhandensein einer mitochondrialen FS-Synthese und ihrer Abhängigkeit vom Starter-Acylrest. Hierzu setzten wir gesättigte Acyl-CoA-Verbindungen mit einer Kettenlänge zwischen 2 und 18 Kohlenstoffatomen als "Starter" ein, um sowohl eine de novo-Synthese als auch die verschiedenen Möglichkeiten einer Kettenverlängerung erfassen zu können. Kondensationspartner war in allen Fällen 2-$^{14}$C-Malonyl-CoA.

Wir fanden unsere Vermutung bestätigt, daß Hefe-Mitochondrien Fettsäuren zu synthetisieren vermögen. In Abb. 18 und 19 sind die Enzymabhängigkeit (a) und der zeitliche Verlauf (b) für die de novo-Synthese (Starter: Acetyl-CoA) und die Kettenverlängerung (Starter: Myristyl-CoA) wiedergegeben. Die Kinetik des Radioaktivitätseinbaus und die Relation zwischen Proteinkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit zeigen lineare Abhängigkeiten.

Die Untersuchung der "Starter"-Spezifität (Abb. 20) zeigte ein unterschiedliches Ausmaß der FS-Synthese bei Verwendung von Acyl-CoA-Derivaten verschiedener Kettenlänge. Die höchsten Synthesegeschwindigkeiten fanden wir mit Acetyl-CoA sowie mit Myristyl-CoA: offensichtlich können in Hefe-Mitochondrien also sowohl die de novo-Synthese von Fettsäuren wie eine Kettenverlängerung stattfinden.

a




b

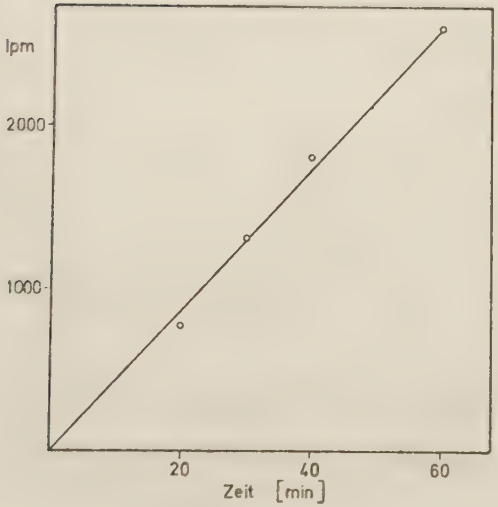
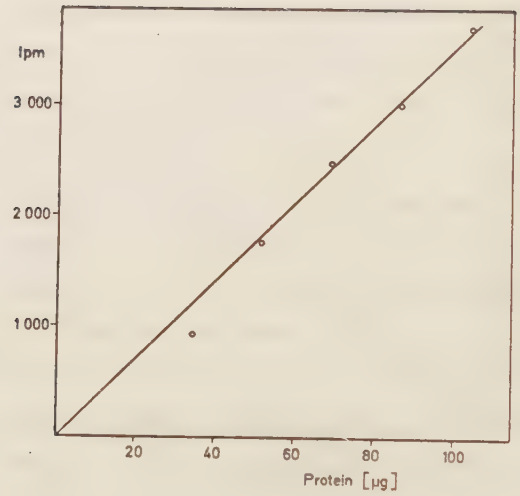



Abb. 18: (a) Protein- und (b) Zeitabhängigkeit der m-Fettsäure-synthese-Aktivität mit Acetyl-CoA als Starter (de novo-Synthese)

(a) Inkubationszeit: 40 min (b) Protein: 0,1 mg (Fraktion 5, s.S.89)
Durchführung vgl. S. 127

a




b

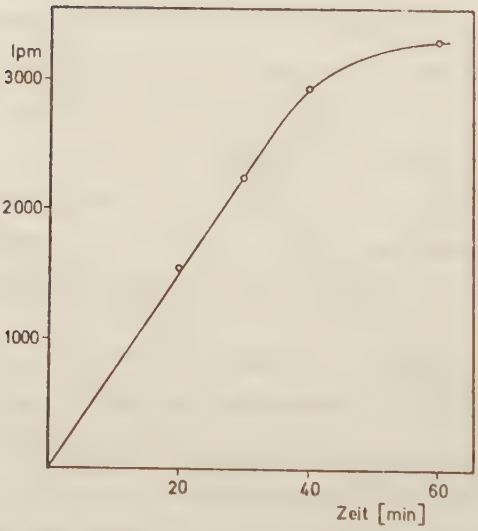
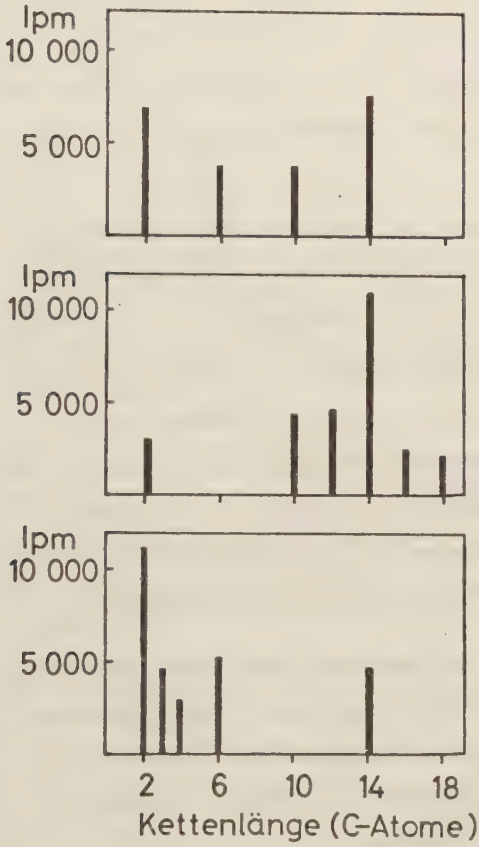



Abb. 19: (a) Protein- und (b) Zeitabhängigkeit der m-Fettsäure-synthese-Aktivität mit Myristyl-CoA als Starter (Kettenverlängerung)
(a) Inkubationszeit: 40 min (b) Protein: 0,09 mg (Fraktion 4, s.S.89
Durchführung s. S. 127




(a) Mitochondrien-Homogenat 0,5 mg Protein

(b) Fraktion 3 der Mitochondriensubfraktionierung (s.S. 89 ), 0,2 mg Protein

(c) Fraktion 5 der Mitochondriensubfraktionierung (s.S. 89 ), 0,1 mg Protein

Abb. 20: Mitochondriale Fettsäuresynthese-Aktivität in Abhängigkeit von der Kettenlänge des Starteracylrestes (Durchführung: s. S. 127 )

Verantwortlich könnten hierfür entweder zwei verschiedene Enzymsysteme oder aber ein Enzymsystem sein, das über zwei oder mehrere Acyltransferasen (vgl. I) unterschiedlicher Kettenlängenspezifität verfügt. Die erstere Annahme wird durch das in Abb. 20 (b) und (c) dargestellte Ergebnis nahegelegt: nach Frak-

tionierung der mitochondrialen Komponenten nach Sottocasa et al. ((120), vgl. VII. 2 und 3) fanden wir in den einzelnen Fraktionen eine ausgeprägte und unterschiedliche Starterspezifität. Auf die Frage nach der Existenz zweier Enzymsysteme wird in VII.6 näher eingegangen.

Im Hinblick der gefundenen Starterspezifität wurden alle folgenden Versuche mit Acetyl-CoA (de novo-Synthese) bzw. Myristyl-CoA (Kettenverlängerung) als Starter durchgeführt.

-b) In allen bisher beschriebenen Versuchen war der Einbau von Radioaktivität aus Malonyl-CoA in Fettsäuren gemessen worden. Es konnte jedoch nicht von vornherein ausgeschlossen werden, daß Acetyl-CoA die wirksame Komponente darstellt, das durch die Wirkung einer in den Mitochondrien evt. vorhandenen Malonyl-CoA-Decarboxylase in den Testansätzen entstanden sein konnte.

Um in diesem Punkt Sicherheit zu gewinnen, wurde Malonyl-CoA durch 1-$^{14}$C-Acetyl-CoA unter sonst identischen Testbedingungen ersetzt. Wie Tab. 11 zeigt, wurde in diesem Fall keine Radioaktivität in die FS-Fraktion inkorporiert, weder mit Acetyl-CoA noch mit Myristyl-CoA als "Starter".

Die Starterspezifität des FSS-Komplexes ist durch die eingehenden Untersuchungen von Pirson (96) bekannt. Vergleicht man diese mit den in Abb. 20 dargestellten Ergebnissen, so ist im Bereich der kurzkettigen Acyl-CoA-Verbindungen (bis 6 C-Atome) eine qualitative Übereinstimmung der Starterspezifität festzustellen (Abb. 20 (b)), während mit CoA-Derivaten höherer Fettsäuren in dieser Beziehung keine Ähnlichkeit besteht (Abb. 20 (c)).

Tab. 11: m-FSS-Aktivität mit Malonyl-und Acetyl-CoA als $C_2$-Baustein.

Die Ansätze enthielten jeweils 0,5 ml Mitochondrien-Protein (gepUmpert und noch zusätzlich mit Ultraschall behandelt): Inkubationszeit: 30 min. Zur Durchführung mit Malonyl-CoA als Kondensationspartner: s.S. 127 ; mit Acetyl-CoA als Kondensationspartner und (a) Acetyl-CoA als Starter: der Ansatz enthielt 30 nMol $^{14}$C-Acetyl-CoA, (b, Myristyl-CoA als Starter: der Ansatz enthielt 20 nMol $^{14}$C-Acetyl-CoA; weitere Bestandteile und Durchführung: S. 127

| "Starter" | Kondensationspartner | |
|---|---|---|
| | 2-$^{14}$C-Malonyl-CoA (1 µC/µMol) | 1-$^{14}$C-Acetyl-CoA (1 µC/µMol) |
| Acetyl-CoA | 3 440 Ipm | 60 Ipm |
| Myristyl-CoA | 3 800 Ipm | 30 Ipm |

Dieser Befund könnte dadurch zu erklären sein, daß in der Mitochondrienpräparation ein kettenverlängerndes System sowie zusätzlich cytoplasmatische FSS (als Verunreinigung) enthalten ist.

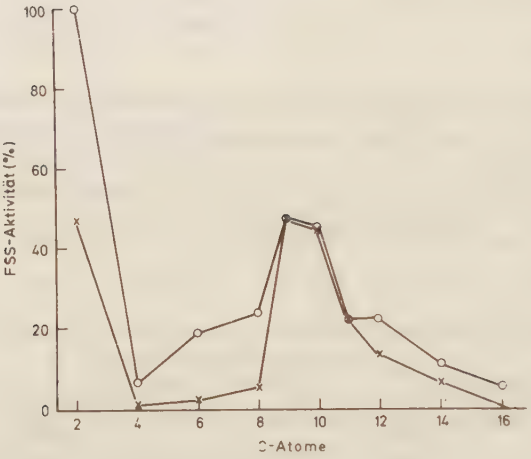



Abb. 21: Einfluß der Kettenlänge des "Starter"-Acyl-CoA auf die FSS-Aktivität (aus Pirson, W. et al., Eur. J. Biochem. 36, 16 (1973)

(o) Maximale Aktivität bei optimalen Acyl-CoA-Konzentrationen gemessen
(x) Aktivität mit 30 µM Acyl-CoA als "Starter"

## 4. Untersuchungen mit Anti-FSS-$\gamma$-Globulinen

Um sicherzustellen, daß die mitochondrialen FS-Synthesen nicht auf eine Verunreinigung der verwendeten Mitochondrienpräparate mit dem FSS-Komplex zurückzuführen sind, griffen wir zu Methoden

der Immunologie. Diese zeichnen sich durch ihre außergewöhnliche Spezifität aus und sind so empfindlich, daß sich mit ihrer Hilfe die Anwesenheit auch sehr geringer Mengen FSS feststellen lassen sollte.

Die Anwesenheit eines Enzyms läßt sich immunologisch am einfachsten in der Weise feststellen, daß man den Enzymtest in Gegenwart des spezifischen Anti-Enzym-Serums durchführt. Bei Anwesenheit des Antigens ist die dann zu erwartende Antigen-Antikörper Reaktion indirekt an einer Verminderung der Enzymaktivität zu erkennen.

Für unsere Untersuchungen standen uns immunologisch homogene, die Aktivität der FSS weitgehend hemmende Anti-FSS-$\gamma$-Globuline zur Verfügung, die von Hess (123) durch Immunisierung von Kaninchen mit reiner Hefe-FSS gewonnen worden waren[1)].

Zunächst untersuchten wir den Einfluß dieser Antiseren auf die Aktivität der m-FS-Synthese mit Hilfe des radiochemischen Tests. Die Ergebnisse sind in Abb. 22 dargestellt.

Es ist ersichtlich, daß die Antiseren im untersuchten Bereich keinen Einfluß auf die Kettenverlängerung von Myristyl-CoA ausüben. Wie schon auf Grund der Starterspezifität zu erwarten, ist die kettenverlängernde Aktivität also nicht auf den FSS-Komplex zurückzuführen.

Die de novo-Synthese hingegen wurde durch die Antiseren bis zu etwa 50 % gehemmt. Entsprechend wurde auch die Aktivität der

---

1) Herr Dr. S. Hess, Max-Planck-Institut für Biochemie, stellte freundlicherweise Anti-FSS-Serum vom Kaninchen zur Verfügung.

isolierten FSS durch die gleichen Antiseren in gleichem Ausmaß, d.h. um etwa 55 %, gehemmt. Für die Deutung dieses Ergebnisses bieten sich zwei Möglichkeiten an:

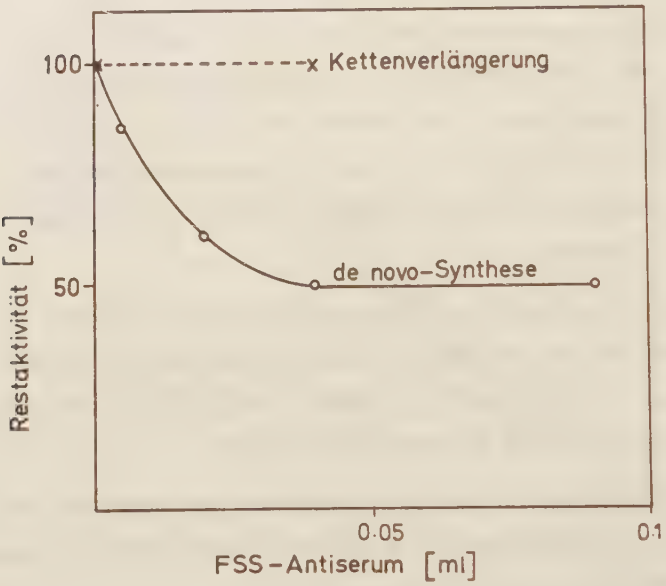



Abb. 22: Abhängigkeit der m-Fettsäuresynthese-Aktivitäten von Anti-FSS-Serum

x -- x : Myristyl-CoA als Starter, 0,11 mg Protein
(Fraktion 4 der Mitochondriensubfraktionierung, s.S.89 )

o -- o : Acetyl-CoA als Starter, 0,1 mg Protein
(Fraktion 5 der Mitochondriensubfraktionierung, s.S.89 )

Inkubationszeit: 1 h; Durchführung: vgl. S. 127

1. Die gefundene de novo Synthese und ihre Aktivitätshemmung durch FSS-Antikörper könnten auf einer Kontamination der Mitochondrienpräparate mit dem FSS-Komplex beruhen. Gegen diese zunächst sehr naheliegende Erklärung sprachen jedoch Ergebnisse von Pirson ( 96): bei seinen Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisierung war die FSS als lösliches Protein des cytoplasmatischen Raums charakterisiert worden; es wurden keine Anhaltspunkte für eine Bindung des Enzyms an Zellstrukturen erhalten. Bindung oder Adsorption der Synthetase an schnell sedimentierende Zellpartikel während der Mitochondrienisolierung (vgl. VII,2) müßte man jedoch zur Erklärung einer Kontamination annehmen.

2. Die Hemmung der m-de novo-Synthese könnte auch ihre Ursache in einer Kreuzreaktion zwischen dem mitochondrialen Enzymsystem und den FSS-Antikörpern haben. Das mitochondriale System müßte in diesem Fall dem polyvalenten Antigen FSS in einigen serologisch wichtigen Strukturbereichen sehr ähnlich sein.

Zur experimentellen Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten eignen sich die Methoden der Doppeldiffusion nach Ouchterlony und der Immunelektrophorese. Beide Verfahren führen einerseits zu einem direkten Nachweis der Antigen-Antikörperreaktion und gestatten zudem einen Vergleich von verschiedenen Antigenen.

Im Doppeldiffusionstest ergab der Mitochondrien-Extrakt mit FSS-Antiserum eine schwache, erst nach einer Proteinanfärbung erkennbare Präzipitationslinie; das Vorliegen einer Antigen-Antikörper-Reaktion war somit gesichert.

Der serologische Vergleich des Mitochondrienextrakts mit reiner FSS als Referenz nach der gleichen Methode ließ jedoch keine Aussage hinsichtlich einer immunologischen Identität (= Ineinanderfließen der Linie) oder Teilidentität (= Spornbildung) zu: zwischen den Stanzlöchern bildeten sich zwar Präzipitationslinien, die sich aber wegen der geringen seitlichen Ausdehnung der mitochondrialen Linie nicht berührten. Verlängerung der Diffusionszeiten führte nur einer gesteigerten Proteindenaturierung, die sich beim Anfärben störend bemerkbar machte, nicht aber zu einer größeren seitlichen Ausdehnung der Präzipitationslinie.

Bei der Immunelektrophorese werden die zu untersuchenden Substanzen zuerst elektrophoretisch aufgetrennt und dann der Doppeldiffusion unterworfen; die Methode erlaubt es daher, geladene Moleküle sowohl auf Grund ihrer elektrophoretischen wie ihrer antigenen Eigenschaften zu differenzieren. Mit Hilfe dieses Verfahrens verglichen wir einen Mitochondrienextrakt mit FSS als bekanntem Antigen (Abb. 23). Mit dem mitochondrialen Substanzgemisch ergab sich zwar ein Immunpräzipitat in seiner typischen Bogenform, jedoch nicht an der dem FSS-Komplex entsprechenden Stelle. Auf Grund dieser deutlich unterschiedlichen Lage der Präzipitationslinien glauben wir, eine Verunreinigung der Mitochondrienpräparate durch cytoplasmatische FSS ausschließen zu können.

Abb. 23: Immunelektrophorese von Mitochondrienextrakt und Fettsäuresynthetase mit Anti-FSS-Serum
A: Mitochondrienextrakt (ca. 25 µg Protein);
B: FSS (ca. 5 µg);
C: Anti-FSS-Serum (1:2 verdünnt)

Das Auftreten eines Immunpräzipitats weist deutlich auf eine Kreuzreaktion hin. Mit den uns verfügbaren Mitteln konnten wir zwar nicht direkt nachweisen, daß das mitochondriale Antigen eine enzymatisch aktive Komponente der Malonyl-CoA-abhängigen de novo-Fettsäuresynthese darstellt; auf Grund der Hemmung dieser Syntheseaktivität durch FSS-Antikörper erscheint es jedoch als sicher, daß in der Hefezelle zwei voneinander verschiedene Enzymsysteme vorhanden sind, die eine de novo-Synthese von Fettsäuren bewirken, und daß das mitochondriale System zumindest einige antigene Determinanten mit dem cytoplasmatischen FSS-Komplex gemeinsam haben muß.

Es sei noch erwähnt, daß mit isoliertem Hefe-ACP und FSS-Antiseren kein Immunpräzipitat mittels Doppeldiffusion und Immunelektrophorese nachgewiesen werden konnte.

Ein entsprechendes Ergebnis erhielten wir nach einer Disk-Immunelektrophorese (77), bei der eine Auftrennung auch nach Molekülgröße erfolgt. Hierbei wanderte die als Antigen wirkende Komponente der Mitochondrien weiter zur Anode ($R_f$ 0,5 in 3,75 %igem Acrylamidgel; System 1 nach Maurer (77 )) als die FSS und dürfte daher auf Grund ihrer größeren elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit ein kleineres Molekulargewicht als die FSS besitzen.

5. Nachweis einer für langkettige Fettsäuren spezifischen Acyl-CoA-Synthetase

Die Aktivierung langkettiger Fettsäuren erfolgt in der Zelle durch membrangebundene Enzyme. Eine ATP-abhängige Palmityl-CoA-Synthetase (Gleichung 8) wurde in der Microsomenfraktion (124-126) sowie in der äußeren Membran von Mitochondrien nachgewiesen, die aus Säugetierzellen isoliert wurden (127-130).
Wie wir fanden (vgl. VII, 6), findet die Kettenverlängerung von Myristyl-CoA in Hefe-Mitochondrien wahrscheinlich an membrangebundenen Enzymsystemem statt (möglicherweise an der äußeren Mitochondrienmembran). In diesem Zusammenhang erweckte die Lokalisierung der Palmityl-CoA-Ligase unser Interesse und veranlaßte uns, Hefe-Mitochondrien auf einen Gehalt dieser Enzymaktivität zu prüfen.

$$R\text{-}COOH + CoA\text{-}SH + ATP \rightleftharpoons R\text{-}CO\text{-}SCoA + AMP + P_oP_o \qquad (8)$$

$$R\text{-}CO\text{-}SCoA + NH_2OH \longrightarrow R\text{-}CO\text{-}NHOH + CoA\text{-}SH \qquad (9)$$

$$R\text{-}COOH + ATP + NH_2OH \longrightarrow R\text{-}CO\text{-}NHOH + AMP + P_oP_o \qquad (10)$$

Mit Hilfe des Hydroxamsäuretests nach Lipmann und Tuttle (131) in der Modifikation von Kornberg und Pricer (132), dessen Prinzip durch die Gleichungen 8 - 10 wiedergegeben werden, konnten wir in Mitochondrien-Homogenaten eine Fettsäureaktivierung nachweisen. Wie Abb. 24 zeigt, wurden die höchsten Aktivitäten mit Myristinsäure und - in etwas geringerem Ausmaß - Palmitinsäure gefunden. Von den untersuchten (gesättigten) Säuren sind diese den länger- und kürzerkettigen Fettsäuren deutlich überlegen.

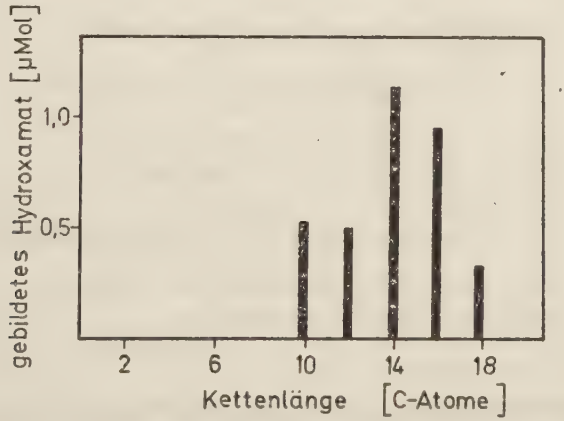



Abb. 24: Kettenlängenspezifität der Fettsäure-Aktivierung

Die Testansätze enthielten jeweils im Volumen von 2,0 ml: 200 µMol Tris·HCl, pH 7,2, 20 µMol KF, 0,5 µMol CoA, 20 µMol ATP, 10 µMol $Mg^{2+}$, 10 µMol DTT, 4 µMol Fettsäure, 1 mMol Hydroxylamin, pH 7,2, und 2 mg Mitochondrien-Protein (homogenisiert). Nach 1 h bei 30° wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 7 % $HClO_4$ abgestoppt. Die durch Zentrifugation erhaltenen Niederschläge wurden mit 4 ml HILL-Reagenz (133) extrahiert. Gebildetes Hydroxamat wurde bei 520 nm ($\varepsilon$ = 1,0 $cm^2/\mu Mol$) gegen einen Blindwert (gleicher Ansatz, sofortige $HClO_4$-Zugabe) gemessen.

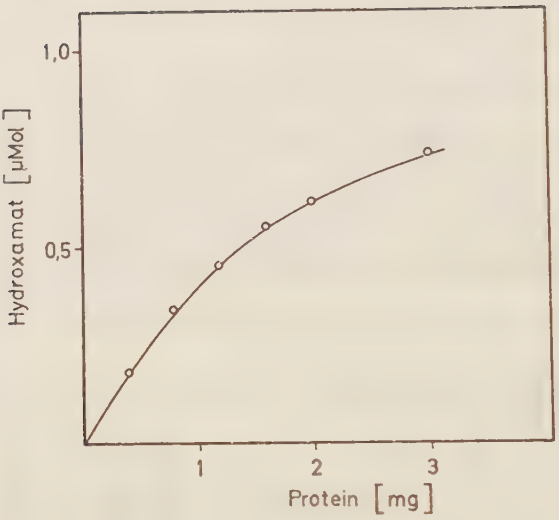



Abb. 25: Proteinabhängigkeit der Myristinsäure-Aktivierung
Protein: wie angegeben; Inkubationszeit: 40 min
Durchführung: vgl. Legende zu Abb. 24

Die Proteinabhängigkeit (Abb. 25) und der zeitliche Verlauf (Abb. 26) der Hydroxamsäurebildung belegen, daß die Aktivierung von Myristinsäure eine enzymkatalysierte Reaktion ist.

Interessant erscheint uns, daß sowohl für die FS-Aktivierung wie für die Kettenverlängerung (Abb. 20) die höchste Aktivität mit dem $C_{14}$-Acylrest (Myristinsäure bzw. Myristyl-CoA) gemessen wurde. Im Zusammenhang mit der Subfraktionierung von Mitochondrien (vgl. VII,6) wird auf eine mögliche Beziehung dieser funktionell verwandten Reaktionen eingegangen.

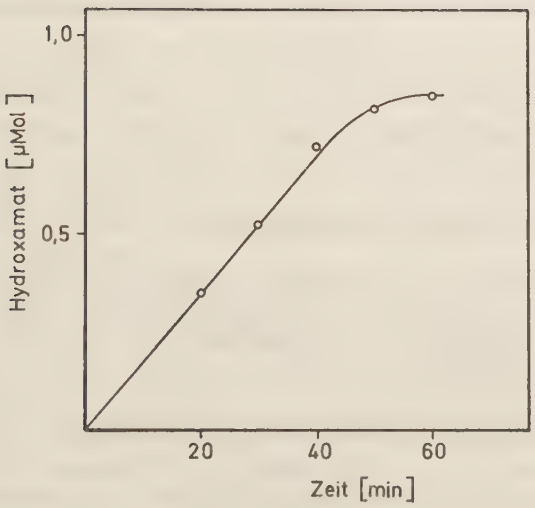



Abb. 26: Zeitabhängigkeit der Myristinsäure-Aktivierung

Inkubationszeit: wie angegeben; Ausführung: s. Legende zu Abb. 24.

## 6. Versuche zur Funktion

Das mitochondriale fettsäuren-synthetisierende Enzymsystem könnte prinzipiell entweder aus einzelnen, nicht assoziierten Enzymen aufgebaut oder in einem Multienzymkomplex organisiert sein. Die erstere Möglichkeit erschien uns wahrscheinlicher. Das ACP sollte in diesem Fall die Funktion eines Protein-Cofaktors ausüben und sich kinetisch wie ein Substrat verhalten: die fettsäure-synthetisierende Aktivität sollte also an die Gegenwart ausreichender ACP-Konzentrationen gebunden sein und in vitro (nach Zerstörung der mitochondrialen Struktur) durch ACP-Zusatz stimuliert werden.

Tatsächlich konnten jedoch, wie schon erwähnt (VII,3), die Aktivitätsteste ohne ACP-Zugabe durchgeführt werden; überraschenderweise zeigte sich sogar, daß der Zusatz steigender Mengen ACP zur geringeren Aktivität sowohl für die de novo-Synthese wie für die Kettenverlängerung führte (vgl. Tab. 12).

Tab.12: Einfluß von ACP-Zusatz auf die m-FSS-Aktivitäten

de novo-Synthese: 0,1 mg Protein (Fraktion 5, Abb. 28)
Kettenverlängerung: 0,1 mg Protein (Fraktion 4, Abb. 28)
a) Malonyl-CoA: 3 µC/µMol; Inkubationszeit: 60 min
b) Malonyl-CoA: 1 µC/µMol; Inkubationszeit: 40 min
Weitere Durchführung: s. S. 127

| | ACP-Zusatz µg | m-FSS-Aktivität (Ipm) Acetyl-CoA | Myristyl-CoA |
|---|---|---|---|
| a | 0 | 11 750 | 11 550 |
| | 30 | 10 600 | 6 970 |
| | 150 | 4 570 | 3 490 |
| b | 0 | 2 480 | |
| | 8 | 2 210 | |
| | 16 | 2 170 | |
| | 24 | 1 700 | |
| | 40 | 1 670 | |
| | 64 | 1 570 | |

Die beobachtete ACP-Unabhängigkeit beider m-FSS-Aktivitäten könnte durch die Annahme erklärt werden, daß in den für diese Versuche verwendeten Mitochondrien-Homogenaten hinreichende ACP-Mengen vorhanden waren, um das Enzymsystem maximal zu stimulieren. In Mitochondrien-Fraktionen, die nur noch einen geringen ACP-Gehalt aufwiesen (vgl. Abb. 29 b), wurden die Aktivitäten jedoch in gleicher Weise durch den ACP-Zusatz beeinflußt (Tab. 12): wiederum fanden wir die höchste Aktivität, wenn kein ACP zugege-

ben wurde, während steigende Mengen zusätzlichen ACPs einen inhibierenden Effekt zeigten.

Wie sich aus den in Abb. 29 dargestellten Ergebnissen ergab, lag der ACP-Gehalt im Testansatz von Tab. 12 jedoch lediglich in der Größenordnung von $10^{-9}$ M; daß eine so geringe ACP-Konzentration zur vollen Aktivitätsstimulierung ausreichend ist, erscheint uns unwahrscheinlich.

Keine weiteren Untersuchungen stellten wir über die Ursache der Aktivitätshemmung durch ACP an. Auf eine mögliche Erklärung wird am Ende dieses Kapitels eingegangen (s. S. 92 ).

Eine alternative Erklärungsmöglichkeit für die ACP-Unabhängigkeit der m-FS-Synthese bietet die Annahme, daß die FS-synthetisierenden Enzymsysteme eine ACP-Funktion fest assoziiert enthalten und daher auf freies ACP nicht angewiesen sind; in ihrem Aufbau wären sie dann nicht mehr mit den Fettsäuren-synthetisierenden Systemen aus Prokaryoten und Chloroplasten vergleichbar. Das von uns isolierte freie Hefe-ACP wäre in diesem Fall kein Bestandteil der m-FSS und sollte bei einer anderen, noch unbekannten, in Hefe-Mitochondrien ablaufenden Reaktion beteiligt sein. Ferner müßten neben dem freien ACP in den Hefe-Mitochondrien weitere Phosphopantethein enthaltende Proteine nachweisbar sein.

Ein Weg zur Klärung der angesprochenen Fragen schien uns der Versuch einer Lokalisierung der Enzymsysteme und des ACP in den verschiedenen mitochondrialen Kompartimenten zu sein. Hierzu verwendeten wir die von Sottocasa et al. ( 120 ) für Rattenleber-

Mitochondrien angegebene Methode, bei der die Auftrennung durch Zentrifugation in einem diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten erfolgt.

Abb. 27a und 29a zeigen schematisch den Aufbau des 4- bzw. 3-stufigen Dichtegradienten (134,120), die Lokalisierung der Banden nach der Zentrifugation, das Fraktionierungsschema sowie (Abb. 27b) die Verteilung zweier Leitenzyme (Citrat-Synthase (CS) als lösliche Komponente des inneren Kompartiments (Matrix) und Cytochrom c-Oxidase als Bestandteil der inneren Membran). Den Angaben in (120,135) zufolge sollte sich die in Tab. 13 aufgeführte Zuordnung treffen lassen.

Tab. 13: Verteilung der verschiedenen mitochondrialen Kompartimente nach der Fraktionierung im Saccharose-Dichtegradienten

| | erwartet in Fraktion Nr. | |
|---|---|---|
| | 3-stuf. Grad. | 4-stuf. Grad. |
| Komponenten des inneren Kompartiments | 1 | 1 |
| Mischpartikel aus innerer und äußerer Membran | | 3 |
| äußere Membran | 2 | 4 |
| Bestandteil des Raumes zwischen den Membranen sowie aus dem inneren Raum freigesetzte lösliche Moleküle | 3 | 5 |

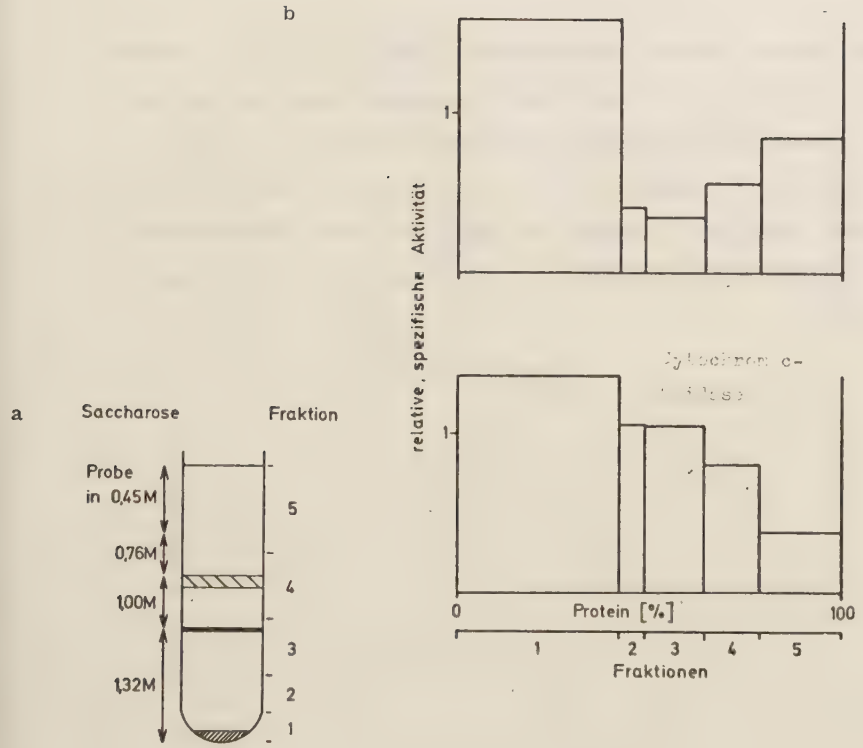



Abb. 27: Subfraktionierung von Mitochondrien nach ( 120)

a) Schema des Dichtegradientenaufbaus und der Fraktionierung nach der Zentrifugation

b) Aktivitätsverteilung von Citrat-Synthase (CS) und Cytochrom c-Oxidase

Bei der gewählten Darstellung sind die in der jeweiligen Fraktion enthaltene Aktivität bzw. Radioaktivität Flächen proportional zur Gesamtaktivität (vgl. Abb. 28 und 29).

Die Ergebnisse unserer orientierenden Versuche zeigten, daß diese Methode nicht bzw. nicht ohne erhebliche Modifikation auf die Trennung der äußeren von der inneren Membran bei Hefe-Mitochondrien übertragbar ist: anstelle der erhofften weitgehenden Separierung fanden wir lediglich eine Anreicherung bzw. Verarmung der Komponenten in den gewonnenen Fraktionen (Abb. 27 b).

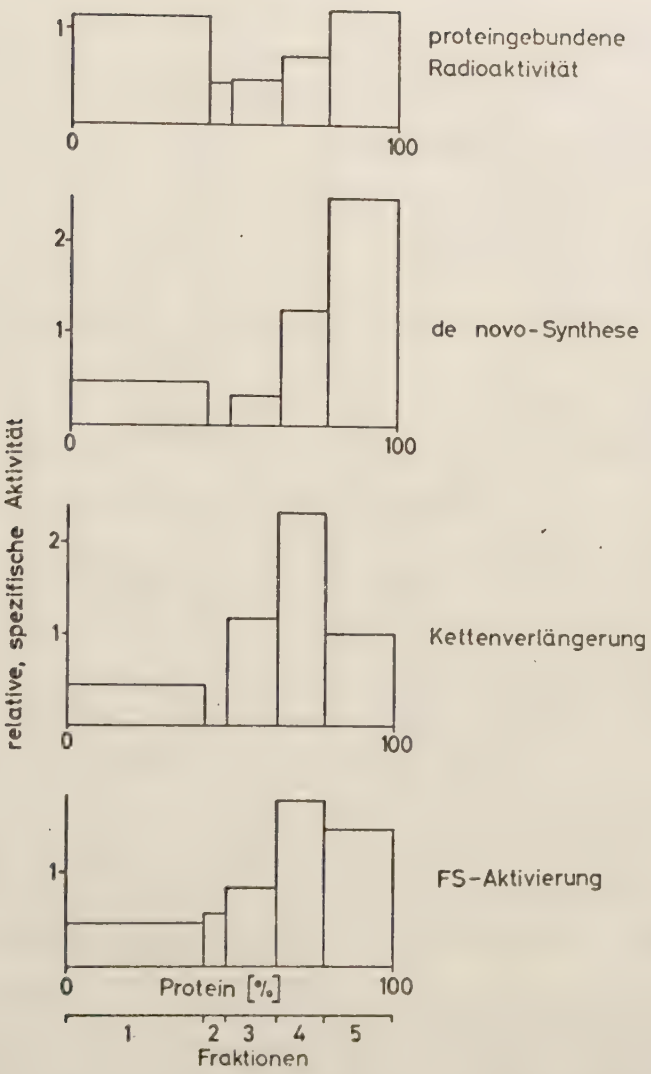
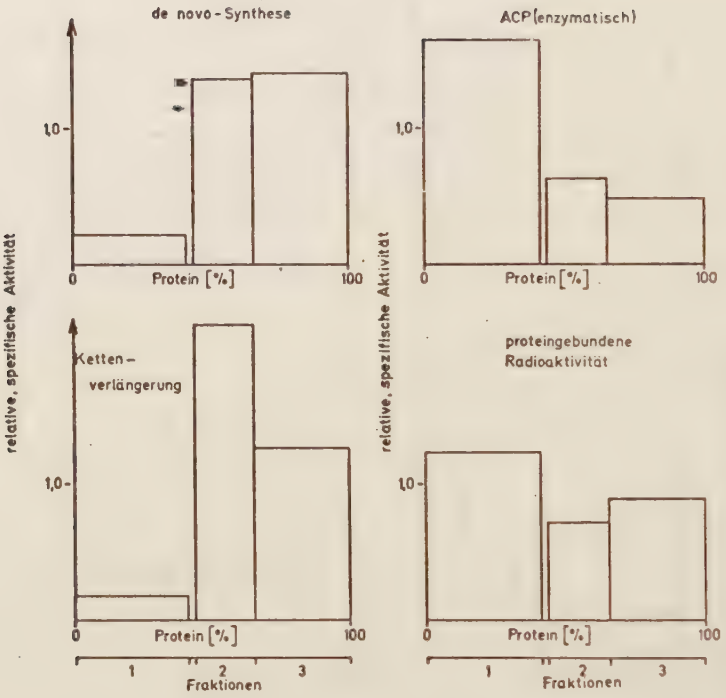



Abb. 28: Verteilung der proteingebundenen Radioaktivität, der m-FSS mit Acetyl-CoA (de novo) bzw. Myristyl-CoA (Kettenverlängerung) als "Starter" und der Myristinsäure-Aktivierung

Protein: 110 mg; proteingebundene Radioaktivität: 1 350 Ipm/mg FSS (de novo): 21 600 Ipm/30 min/mg; FSS (Kettenverlängerung) 21 900 Ipm/30 min/mg; FS-Aktivierung: 17 mU/mg

a




b

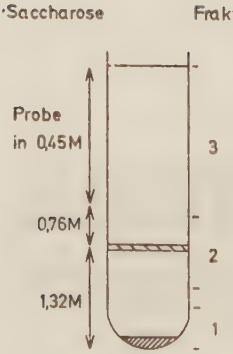



Abb. 29: Subfraktionierung von Mitochondrien

a) Aktivitätsverteilung der de novo-Synthese und der Kettenverlängerung, des ACP sowie der proteingebundenen Radioaktivität

b) Schema des Dichtegradientenaufbaus und der Fraktionierung

Protein: 300 mg

Protein-geb. Radioaktivität: 1 930 Ipm/mg

FSS(de novo): 6 600 Ipm/30 min/mg

FSS(Kettenverlängerung): 6 300 Ipm/30 min/mg

ACP:0,186 mE/mg

Das Ergebnis dieser Versuche (Abb. 28 u. 29) zeigte, daß die Verteilung des ACP mit den Enzymen der de novo-Synthese und der Kettenverlängerung nicht übereinstimmt; auch diese beiden Enzymsysteme sind ganz verschieden auf die einzelnen Fraktionen verteilt, während sich Kettenverlängerung und FS-Aktivierung gleichartig verhalten. Trotz der oben erwähnten Einschränkungen der Aussagekraft der Fraktionierungsmethode macht das Resultat folgende Verteilung der untersuchten Komponenten wahrscheinlich: ACP dürfte im inneren Kompartiment der Mitochondrien und die mitochondriale de novo-FS-Synthese im Raum zwischen den Membranen lokalisiert, die Kettenverlängerung und FS-Aktivierung dagegen an die äußere Membran gebunden sein.

Dafür spricht auch folgendes Ergebnis (Tab. 14): die im Mitochondrien-Homogenat enthaltene FSS-Aktivität mit Acetyl-CoA als Starter findet sich nach Zentrifugation überwiegend in der löslichen Fraktion (Ansatz 1), mit Myristyl-CoA als Starter hingegen fast vollständig im Niederschlag (Ansatz 2a). Wird die Suspension hingegen beschallt, geht die Myristyl-CoA-abhängige Aktivität teilweise in Lösung (Ansatz 2b); noch weitergehende Solubilisierung erfolgt unter der Einwirkung von Digitonin, das zu einer Auflösung der äußeren Membran führt (119 ) (Ansatz 3).

Daß gerade die Fraktionen mit dem höchsten ACP-Gehalt nur mäßige Aktivitäten aufweisen, hohe Aktivitäten dagegen in Fraktionen mit geringem ACP-Gehalt gefunden wurden, ist ein weiterer Hinweis gegen eine Beteiligung des ACP an der mitochondrialen de novo-Synthese und der Kettenverlängerung.

Tab. 14: Verteilung der m-FSS-Aktivitäten auf lösliche und unlösliche Fraktionen

| Ansatz | 1 | 2a | 2b | 3 |
|---|---|---|---|---|
| Starter | Acetyl-CoA | Myristyl-CoA | | |
| Homogenat | 12 800 Ipm | 7 400 Ipm | - | 7 050 Ipm |
| Niederschlag (resuspend.) | 8 700 " | 6 800 " | 2 810 Ipm | 1 500 Ipm |
| Überstand | 10 000 " | 300 " | 2 440 " | 4 500 Ipm |
| Überstand / Niederschlag | 1,2 | 0,044 | 0,87 | 3 |

Die Frage nach der Funktion des freien ACP bleibt somit weiter ungeklärt.

Eine Erklärung dafür, daß das freie ACP dennoch eine Hemmwirkung auf beide Reaktionen ausübt (Tab. 12), bietet die Annahme, daß ACP - SH als Akzeptor für den Malonylrest mit dem Enzymsystem konkurrieren und somit eine kompetitive Inhibierung ausüben könnte. So wurde eine Aktivitätshemmung des FSS-Multienzymkomplexes aus Euglena gracilis durch ACP-SH aus E. coli von Goldberg et al. ( 25 ) festgestellt. Vergleichbar wäre dieser Effekt mit der von Schweizer ( 136 ), Oesterhelt ( 38 ) und Weithmann (137) untersuchten Hemmung des FSS-Komplexes aus Hefe durch CoA-SH, die ebenfalls auf einer Kompetition um den Malonylrest beruht. Die Möglichkeit der Übertragung des Malonylrestes von E. coli-ACP auf Hefe-FSS (Reaktion in "umgekehrter Richtung") dürfte auf Grund der von Arnstadt ( 139 ) festgestellten FSS-Aktivität als sicher anzusehen sein.

Bei Zugabe von M.phlei-ACP zum fettsäuren-synthetisierenden Enzymsystem aus E. coli (Fraktion A einschließlich E.coli-ACP) fand Matsumura (139) bei seinen Untersuchungen einen ähnlichen Hemmeffekt. Darüber hinaus wurde gefunden, daß M. phlei-ACP zwar Aktivität im $CO_2$/Malonyl-CoA Austauschtest (mit E. coli-Enzymen) zeigt, jedoch nicht in der Lage ist, E. coli-ACP bei der Synthese von Fettsäuren im Enzymsystem aus E. coli zu ersetzen.

Die in Abb. 28 und 29 dargestellte Verteilung der proteingebundenen Radioaktivität auf die verschiedenen Mitochondrien-Subfraktionen, die weder mit ACP noch mit de novo-Synthese oder Kettenverlängerung übereinstimmt, ist wohl als Ergebnis einer Addition verschiedener pantothenathaltiger Komponenten zu verstehen. Demnach sollten neben dem ACP in Hefe-Mitochondrien noch weitere pantothensäurehaltige Proteine vorkommen. Um diese Annahme zu belegen, analysierten wir eine submitochondriale Fraktion mit hohen Aktivitäten in der de novo-Synthese und Kettenverlängerung, aber nur geringem ACP-Gehalt (Fraktion 3 aus Abb. 29) an Sephadex G 75. Die Radioaktivitätsverteilung bis zur Elution der niedermolekularen Komponenten ist in Abb. 30 wiedergegeben.

Der zuletzt eluierte der drei gefundenen Radioaktivitätsgipfel ist auf freies ACP zurückzuführen, wie der Vergleich mit dem Elutionsverhalten des Cytochrom c an der gleichen Säule zeigt. Darüberhinaus sind zwei weitere Radioaktivitätsgipfel sichtbar: Ein Teil der Radioaktivität wurde mit dem Ausschlußvolumen eluiert (Fraktion 20/21), ein anderer Teil etwas später, ent-

sprechend einem Molekulargewicht von weniger als 70 000 Dalton (Fraktion 26) ( 64 ). Das Ergebnis zeigt, daß das ACP nicht das einzige pantothensäurehaltige Protein in Hefe-Mitochondrien darstellt.

Weitere Versuche zur Funktion dieser pantothensäurehaltigen Proteine führten wir nicht durch; es ist anzunehmen, daß sie mit den FSS-Aktivitäten der Mitochondrien in Zusammenhang stehen.

Nach einer entsprechenden gelchromatographischen Auftrennung eines nicht radioaktiv markierten Mitochondrien-Homogenats fanden wir in dem mit dem Ausschlußvolumen eluierten Material FSS-Aktivität, die durch Zusatz steigender Mengen ACP zunehmend gehemmt wurde (vgl. Tab. 12).

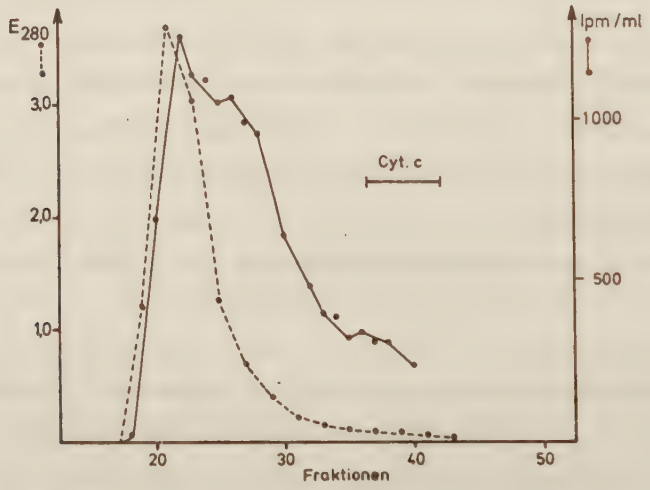



Abb. 30: Gelfiltration einer $^{14}$C-Pantothensäure markierten Mitochondrien-Subfraktion an Sephadex G 75

Säule: 2 x 20 cm; Puffer: 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, 0,01 M Thioglycol, 1 mM EDTA; Fraktionsvolumen: 1 ml; Auftrag: 22 mg Protein (Fraktion 3, s. Abb. 29)

## 7. Diskussion

Die in diesem Kapitel mitgeteilten Ergebnisse zeigen, daß in Hefe-Mitochondrien zwei die Synthese von Fettsäuren katalysierende Enzymsysteme vorhanden sind: ein de novo synthetisierendes und ein kettenverlängerndes System. Beide benötigen Malonyl-CoA als Substrat; in Bezug auf ihre enzymatische Aktivität sind sie nicht auf freies ACP angewiesen. Es ist demnach anzunehmen, daß der Reaktionsweg der mitochondrialen FS-Synthese dem durch die cytoplasmatische FSS katalysierten gleicht. Ausgehend von gezüchteter Hefe wurde in den gereinigten Mitochondrien (vgl. VII,2) bis zu 2,2 mU/g Hefe FSS-Aktivität mit Acetyl-CoA bzw. 2,1 mU/g Hefe mit Myristyl-CoA als "Starter" erhalten. Der Gehalt der Hefe an cytoplasmatischer FSS beträgt etwa 0,75 U/g Hefe (38) und ist demnach ca. 350-fach größer als die gefundenen mitochondrialen FSS-Aktivitäten.

Die Versuche zur submitochondrialen Lokalisierung weisen daraufhin, daß beide Synthetasen dem äußeren mitochondrialen Kompartiment angehören: das kettenverlängernde System - zusammen mit der Acyl-CoA-Ligase - der äußeren Membran (gebunden oder assoziiert), das de novo synthetisierende (löslich) dem Raum zwischen den Membranen.

Wie bereits erwähnt, ist die äußere Membran für niedermolekulare Verbindungen durchlässig; in dieser Hinsicht ist so das äußere mitochondriale Kompartiment in der lebenden Zelle nicht vom umgebenden Cytoplasma getrennt. Es ist deshalb möglich, daß das für beide FS-synthetisierende Prozesse notwendige

Malonyl-CoA dem Cytoplasma entstammt. Diese Annahme wird unterstützt durch Versuche von Krippahl (140), der zeigen konnte, daß Hefe-Mitochondrien bei Inkubation mit radioaktiv markiertem Acetat unter aeroben Bedingungen keine Radioaktivität in die Fettsäure-Fraktion einzubauen vermögen; eine mitochondriale Acetyl-CoA-Carboxylase ist demnach offensichtlich nicht vorhanden.

Die äußere Mitochondrienmembran besitzt in ihrer Enzymzusammensetzung keine für den Energiestoffwechsel (Energiegewinnung und verwandte Reaktionen) charakteristischen Enzymaktivitäten; vielmehr gleicht ihre enzymatische Ausstattung auffallend derjenigen des endoplasmatischen Retikulums: mit ganz wenigen Ausnahmen bei Mitochondrien aus Säugerzellen wurden alle Enzymaktivitäten der äußeren Membran auch in der Microsomenfraktion nachgewiesen, wenn auch mit gewissen qualitativen (Spezifität, kinetische Eigenschaften) und quantitativen Unterschieden (Größe der Aktivität). Es erscheint uns daher wahrscheinlich, daß die FS-Kettenverlängerung wie auch die FS-Aktivierung außer in der äußeren Mitochondrien-Membran auch im endoplasmatischen Reticulum zu finden ist.

Es ist interessant, daß in säugetierischen Zellen neben der durch den FSS-Komplex katalysierten cytoplasmatischen de novo-FS-Synthese einerseits in der Mikrosomenfraktion eine Malonyl-CoA-abhängige Verlängerung von Fettsäuren mit Kettenlängen von 10 - 14 C-Atomen erfolgt (141-145), zum anderen in den Mitochondrien ein Malonyl-CoA-unabhängiges System zur Verlängerung von FS mittlerer Kettenlänge existiert (145-148). Komponenten

dieses Enzymsystems sind die Enzyme der ß-Oxidation sowie eine am FS-Abbau nicht beteiligte pyridinnucleotidspezifische Enoyl-CoA-Reduktase (149); der von der Thiolase katalysierte kettenverlängernde Schritt benutzt Acetyl-CoA als Kondensationspartner. Als Funktion dieses Systems wurde von Seubert (150) eine Energiespeicherung vorgeschlagen, da das Ausmaß der Synthese vom intramitochondrialen $NAD^+$/NADH-Potential gesteuert wird.

Da unsere Versuche keine Anhaltspunkte für die Existenz einer Malonyl-CoA-unabhängigen FS-Synthese in Hefe-Mitochondrien ergeben haben, ist nicht auszuschließen, daß derartige Systeme nur in hochdifferenzierten Lebewesen vorkommen.

Die biologische Bedeutung des kettenverlängernden Enzymsystems dürfte in der Modifizierung gesättigter und wohl auch ungesättigter Fettsäuren liegen, so daß sie, in geeignete Form umgewandelt, als Lipidbausteine für die Ausbildung funktionsfähiger Membranen dienen können; hierbei könnten auch Fettsäuren mit ungewöhnlicher Lage der Doppelbindung entstehen (151).

Unser Befund der maximalen Aktivität der FS-Kettenverlängerung mit Myristyl-CoA als Starter steht im Einklang mit den Ergebnissen von Orme et al. (125). Diese Autoren führten Züchtungsversuche mit einer Hefe-Mutante durch, die keine FSS zu synthetisieren vermag und dementsprechend auf die Anwesenheit geeigneter FS im Nährmedium angewiesen ist. Ihre Ergebnisse zeigten, daß der Bedarf an FS am besten durch Myristinsäure gedeckt wurde, wobei diese den FS mit Kettenlängen von 13 und 15 C-Atomen deutlich überlegen war. Die Analyse der FS-Zusammensetzung so gezüchteter

Hefezellen ergab, daß die Myristinsäure - neben einer Desaturierung - fast vollständig verlängert worden war (überwiegend um eine, in geringerem Ausmaß um zwei $C_2$-Einheiten). Der in (125) geäußerten Annahme, daß hieran keine mitochondrialen Prozesse beteiligt seien, können wir uns nicht anschließen.

Über die biologische Funktion der mitochondrialen de novo-FS-Synthese sowie über einen eventuellen funktionellen Zusammenhang beider Systeme (im Sinne einer sich ergänzenden Reaktionsfolge) können wir auf Grund unserer Ergebnisse keine Aussage treffen.

Es erscheint möglich, die Bedeutung der mitochondrialen FS-synthetisierenden Prozesse auf zwei sich ergänzenden Wegen zu erhellen: einerseits mit so weitgehend getrennten submitochondrialen Fraktionen, daß man beide Systeme einzeln und ohne störende Einflüsse studieren kann; andererseits durch Versuche mit intakten Mitochondrien, die ein zufriedenstellendes Ausmaß der Kopplung zwischen Atmung und oxidativer Phosphorylierung aufweisen.

Erste orientierende Versuche in beiden Richtungen wurden zwar durchgeführt (vgl. VII, 6); diese und andere neue Fragen, die durch den Nachweis zweier Malonyl-CoA-abhängiger FS-synthetisierender Prozesse in Hefe-Mitochondrien aufgeworfen wurden, eingehend zu untersuchen, hätte jedoch den Rahmen dieser Arbeit überschritten.

## VIII. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION ZU III - VII

Unsere Ergebnisse beweisen, daß in der Hefe ein Protein mit den typischen Eigenschaften eines ACP vorkommt. Der Gehalt der Hefezellen an ACP ist sehr gering: 1-2 mg/kg Hefe (feucht). Man muß deshalb die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß das ACP gar nicht Bestandteil der Hefe selbst ist, sondern kontaminierenden Bakterien entstammt, die in der kommerziellen Bäckerhefe enthalten sein können. Durch den Nachweis des ACP in bakterienfrei gezüchteter Hefe (vgl. Kap. III, 2), sowie durch Isolierung von radioaktiv markiertem ACP nach Züchtung der Hefe auf $^{14}C$-Pantothensäure-haltigem Medium (Kap. IV,5) schlossen wir diese Möglichkeit aus. Der geringe ACP-Gehalt dürfte vielmehr mit der Lokalisierung des ACP in den Mitochondrien im Zusammenhang stehen; es sei erwähnt, daß pflanzliche Zellen, bei denen das ACP in den Chloroplasten gefunden wurde, einen ähnlich niedrigen ACP-Gehalt aufwiesen.

Der Nachweis des ACP in Hefe legt die Vermutung nahe, daß entsprechende Proteine mit den für Acyl-Carrier-Proteine charakteristischen Eigenschaften auch in anderen eukaryotischen Zellen vorkommen. Tatsächlich gelang Numa und Mitarbeitern (152) - unter Verwendung der Ergebnisse dieser Arbeit - der Nachweis eines Proteins mit ACP-Eigenschaften in Candida, einem der Bäckerhefe in der Evolution sehr nahestehendem Mikroorganismus. Ebenso weisen die Ergebnisse von Greull (153) auf die Existenz eines solchen Proteins in Penicillium patulum hin. Das allgemeine Vorkommen "ACP-ähnlicher" Proteine in eukaryotischen Mikro-

organismen ist also als sehr wahrscheinlich anzusehen. Demgegenüber konnten wir in der Schweineleber kein hitzestabiles Protein nachweisen, das E. coli-ACP im Austauschtest zu vertreten imstande war.

Die von uns durchgeführten Versuche zur biologischen Funktion des Hefe-ACP befaßten sich mit der Frage nach einer Beteiligung des Proteins an den Prozessen der mitochondrialen Fettsäuresynthese. Auf Grund der Coenzym-Aktivität des ACP im $CO_2$ Malonyl-CoA-Austauschtest (der den entscheidenden spezifischen Schritt der Fettsäurebiosynthese, die Kondensationsreaktion, beinhaltet) erschien diese Möglichkeit als besonders naheliegend. Mitwirkung bei der Fettsäuresynthese ist zudem die weitestverbreitete Funktion der bekannten AC-Proteine.

Da unsere Versuche jedoch keinen Hinweis auf eine Beteiligung des freien ACP an den mitochondrialen Fettsauresynthese-Prozessen ergaben, muß esseine Funktion als Cofaktor anderer Reaktionen ausüben. Allgemein betrachtet stellt ACP ein CoA-analoges Protein dar (s. Abb. 31).

Unter diesem Gesichtspunkt kann man vermuten, daß das ACP eine Rolle bei der Lipidbiosynthese spielen könnte: Acyl-ACP, gebildet in einer Acyl-ACP-Synthetase-Reaktion (ein solches Enzym ist in E. coli nachgewiesen worden (154)),könnte als Donator des Acylrests etwa bei Veresterungsreaktionen dienen; eine derartige Acyl-ACP-Beteiligung wurde in verschiedenen Organismen nachgewiesen (155-160).

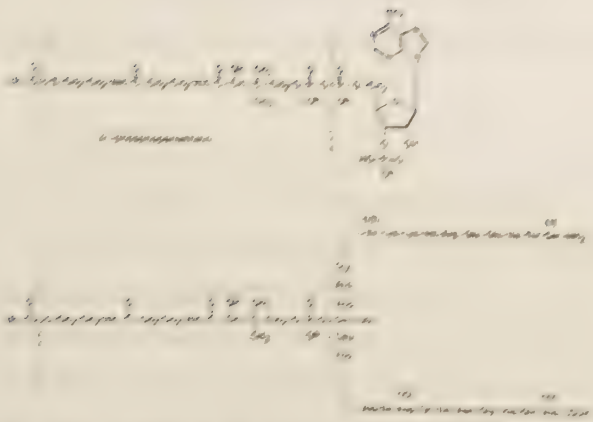


Abb. 11: Die chemische Struktur von CoA und ACP

Vorstellbar wäre ferner, daß ein an ACP gebundener Acylrest der Acylierung entzogen wäre, bei der ja auch in den Mitochondrien alkalisierende Oxidation der Fettsäuren dienen Acyl-CoA-Verbindungen als Substrate. Für eine Beteiligung des ACP am Fettsäureabbau gibt es in der Literatur keine Hinweise.

Erwähnt sei, daß Mitochondrien und Promitochondrien in Hefe sich in ihrer Lipidzusammensetzung erheblich unterscheiden (161-163); eine Mitwirkung des ACP bei der Biogenese der Mitochondrien erscheint somit denkbar.

Eine weitere allgemeine Bedeutung Pantothein-haltiger Proteine besteht darin, daß die Acylreste in aktivierter Form bei zwei- und mehrstufigen Reaktionsabläufen zwischen den räumlich getrennten aktiven Zentren der die einzelnen Schritte katalysierenden

Enzyme übertragen können. Dies trifft auf die Fettsäuresynthetasen ebenso zu wie etwa auf die Peptidantibiotica-Synthetasen (z.B. Gramicidin S-Synthetase), Citrat-Lyase oder Citramalat-Lyase.

Die prokaryotischen und pflanzlichen FS-synthetisierenden Enzymsysteme stellen demnach in dem Sinn einen Sonderfall dar, daß sie eine geordnete Struktur nur in vivo aufweisen (hierfür gibt es Hinweise (164)), mit üblichen proteinchemischen Methoden jedoch als einzelne Proteine isoliert werden. Es ist denkbar, daß Hefe-ACP in vivo Bestandteil eines derartigen Enzymkomplexes mit unbekannter Funktion ist. Soweit bisher untersucht, zeigte allerdings kein Pantethein-haltiges Protein außer den Acyl-Carrier-Proteinen der Fettsäuresynthetasen Aktivität im $CO_2$/Malonyl-CoA-Austauschtest.

Die Frage nach der biologischen Funktion des freien Hefe-ACP muß also im Moment noch offen bleiben. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um seine Bedeutung im mitochondrialen Stoffwechsel zu erhellen.

# IX. EXPERIMENTELLER TEIL

## 1. Allgemeines

### a. Verwendete Geräte

Präparative Zentrifuge, W. Stock Maschinenbau KG

Automatic Superspeed Centrifuge RC-2 und RC-2B, Sorvall

Präparative Ultrazentrifugen Typ L 40, L 3-40 und L 2-65B, Beckman

Tischzentrifuge Christ Superspeed Junior 1

pH-Meter Typ pH 27, Knick, Berlin und Typ 11/12, Pusl, München mit Glaselektroden, Ingold

Photometer "Eppendorf" mit Transformationsstufe, Netheler und Hinz, und Kompensograph, Philips

Spektralphotometer M 4 Q II mit T/E-Wandler, Zeiss

Kompensationsschreiber Servogor S, Metrawatt

Flüssigkeitsszintillationszähler, Modell 314 EX, 3880 und 544, Packard

Radiopapierchromatograph Modell FH 452, Friesecke und Höpfner mit Linienschreiber

Fraktionskollektoren UltraRac, LKB

Durchflußphotometer Uvicord II mit Punktschreiber, LKB

Schlauchpumpen Perpex, LKB

Isoelektrische Fokussierungs-Apparatur, 110 ml, LKB

Gleichspannungs-Speisegeräte der Fa. Camag und Hölzel

Zellhomogenisator, Manton-Gauglin Manuf. Co.

Kleines und großes Zellaufschlußgerät nach Merkenschlager, Schloßmann und Kurz, Eigenbau, Moosbauer

Shandon Universal-Elektrophoresekammer U 77, Typ II mit Zubehör für Immuno-Elektrophorese

Hochdruckdampfsterilisator, Küster, Berlin

Photomikroskop mit Phasenkontrast-Einrichtung, Zeiss

Gyrotory Incubator-Shaker, New Brunswick, USA

$O_2$-Elektrode nach Clark, Rank Brothers, Northingham

Sonifier, Branson

Gelelektrophoresegerät "UltraPhor", Colora

Aminosäureanalysator LC 6000, Biotronik mit Philips-Schreiber PM 8221

Rotavapor 'R', Büchi

b. Käufliche Chemikalien/Materialien

Proteine und Coenzyme wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Fa. Boehringer C.F., Mannheim, bezogen.

Im folgenden nicht eigens aufgeführte Chemikalien stammten von der Firma E. Merck, Darmstadt, und/bzw. Merck-Schuchardt, Hohenbrunn.

Serumalbumin vom Rind, Agarose (Behringwerke, Marburg)

Sephadex, Dextranblau (Pharmacia, Freiburg)

Ampholine (LKB, Gräfelfing)

1-$^{14}$C-ß-Alanin (NEN, Dreieichenhain)

1-$^{14}$C-Essigsäureanhydrid, $Na_2$-2-$^{14}$C-Malonat, Na-$^{14}$C-Hydrogencarbonat (Amersham-Buchler, Braunschweig)

PPO, POPOP, Instagel, Soluene 100 (Packard Instruments, Frankfurt)

Unisolve I (Zinser, Frankfurt)

Reagenzien für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese, Na-Dodecylsulfat, Coomassie Brillant Blue G 250, Dowex-Ionenaustauscher,

Brij 58, DTT, Visking-Dialysierschläuche (Serva, Heidelberg)

Thioglycol, DTNB (Fluka)

DEAE-Cellulose, Papiersorte 1 (Whatman)

Helicase (L'Industrie Biologique Francaise S.C., Gennevilliers)

Niax Polyol, LHT 67, Antischaummittel (Brenntag, Mühlheim)

Biologische Nährmedien (Difco)

Aluminiumoxid (ICN-Woelm, Eschwege)

Hühnerleber (Distler, München)

Bäckerhefe (Hefe-Mayr, München)

Stickstoff, nachgereinigt (Linde, München)

E.coli-Bakterien (gefroren) wurden dankenswerterweise von Fa. Boehringer und Söhne und Fa. Bayer AG zur Verfügung gestellt.

## 2. Allgemeine analytische Methoden

### a. Protein-Bestimmung

Protein wurde überwiegend nach der Biuret-Methode von Beisenherz et al. (165) bestimmt (FSS in der von Oesterhelt (38) angegebenen Modifikation). Der Gehalt verdünnter Proteinlösungen wurde nach Lowry et al. (166) gemessen.

### b. $^{14}C$-Radioaktivitätsbestimmung

Zur Radioaktivitätsbestimmung wässriger Lösungen wurden Aliquote auf Filterpapierstreifen (Whatman I, 3 x 7,5 cm) aufgetragen und nach dem Trocknen unter Toluol-Szintillationslösung im Flüssigkeits-Szintillationszähler gezählt; bei geringen Radioaktivitäts-

mengen wurden die Proben 10 min gezählt, und der vorher ermittelte Blindwert wurde berücksichtigt.

Toluollösliche Substanzen wurden direkt in Szintillationslösung gezählt.

Zusammensetzung der Szintillationslösung: 5 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 0,5 g 1,4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl-)benzol (Dimethyl-POPOP) in 1 l absolutem Toluol.

Größere Mengen wässriger Lösungen wurden in Unisolve 1 oder Instagel gezählt.

c. Protein-gebundene Radioaktivität

Zur Bestimmung der proteingebunden $^{14}C$-Pantothensäure wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen 2 M Hydroxylamin, pH 7,5, versetzt; nach 30 min bei Raumtemperatur wurde 3 M TCE (Endkonz.: 0,5 M) zugegeben. Nach Zentrifugation wurde der Niederschlag zweimal durch Resuspendieren in 0,3 M TCE und Zentrifugieren gewaschen und anschließend in Ameisensäure oder Soluene 100 gelöst. Nach dem Auftrag auf Papier (bei Ameisensäure) oder Zugabe von Instagel (bei Soluene 100) wurde die Radioaktivität bestimmt.

d. Polyacrylamidgel-Elektrophoresen

Die Elektrophoresen in Polyacrylamidgelen wurden in Glasröhrchen der Größe 100 x 6 und 150 x 6 mm durchgeführt. Die Trenngelhöhe betrug 6 bzw. 11 cm. Die apparative Ausrüstung ist in (153, 167) beschrieben.

Die Disk-Elektrophoresen wurden bei 4° C durchgeführt. Es wurden 10-100 µg in weniger als 0,1 ml aufgesetzt. Ein Sammelgel wurde nicht benutzt.

Verwendet wurde das System 1 und 6 nach Maurer (77). Die Monomerenkonzentration der Gele betrug 3,75 % Acrylamid bei der Reinheitsprüfung der FSS und 12 % bei ACP-Präparaten.

Elektrophoresen in SDS-haltigen Polyacrylamidgelen wurden nach der auf die Arbeiten von Shapiro et al. (86) basierenden Methode von Weber und Osborn (78) bei Raumtemperatur durchgeführt.

Färben und Entfärben der Gele erfolgte nach (78).

e. Radioaktivitätsbestimmung in Polyacrylamidgelen (77)

Das in Scheiben geschnittene Gel wurde mit $H_2O_2$ versetzt: 0,1 ml/30 % $H_2O_2$/mm Gellänge und bis zur Auflösung bei 40° C inkubiert (evtl. nach erneuter $H_2O_2$-Zugabe). Die Lösung wurde auf Papier aufgetragen und im Szintillationszähler gemessen.

3. Synthese und Bestimmung von CoA- und Pantothensäure-Derivaten

a. Synthesen

Acetyl-, Propionyl- und Butyryl-CoA nach (168), Caproyl-, Caprinyl- und Lauryl-CoA nach (169, 136); Myristyl-, Palmityl- und Stearyl-CoA nach (170) mit geringen Modifikationen (Ansatz unter $N_2$, Pufferung durch $NaHCO_3$, ohne Thioglykolsäure); Malonyl-CoA nach (171), 2-$^{14}$C-Malonyl-CoA nach (171) in der von Weithmann (137) angegebenen Modifizierung.

1-$^{14}$C-Pantothensäure in Anlehnung an (172) nach (136); Ausbeutebestimmung aus der Radioaktivitätsverteilung nach einer papierchromatographischen Trennung (Whatman 1, Laufmittel: n-Butanol: Eisessig : Wasser (4:1:1), absteigend).

Pantethein durch alkalische Verseifung (172, 174) von Benzoylpantethein (175).

b. Bestimmung

CoA nach (176) und (44); Acetyl-CoA nach (177), Malonyl-CoA nach (178); alle anderen CoA-Derivate durch Messen der Absorption bei 260 nm (Adenin) und 232 nm (Thioester) (170) oder durch Differenzmessung der Thioesterabsorption gegen eine verseifte Probe (179).

4. Enzymisolierungen

a. Isolierung und Aktivitätstest der Fettsäuresynthetase

FSS wurde aus käuflicher Bäckerhefe nach dem von Oesterhelt (38) und Lynen (121) beschriebenen Verfahren isoliert. Ein Enzym, das bei Disk-Elektrophoresen keine Verunreinigungen mehr aufwies, wurde durch Zentrifugation in einem Saccharose-Dichtegradienten erhalten.

α) Zentrifugation im Zonalrotor (65 ti, Beckmann): Es wurde ein logarithmischer Gradient von 5-20 % Saccharose (g/v) benutzt, der in Bezug auf den Radius angenähert linear war. Aufgetragen wurden bis zu 300 mg Protein/FSS in 20 ml; Zentrifugationsdauer: 3,5 h bei 48 000 Upm.

ß) Zentrifugation in SW-Rotor SW 27: Geringe Mengen FSS (bis zu 10 mg in 0,6 ml/Röhrchen) wurden in einem linearen 10-25 %igen Saccharosegradienten gereinigt; Zentrifugationsdauer: 15 h bei 23 000 Upm.

Die Aktivitäsbestimmung der FSS erfolgte im Standard-Enzymtest nach (38).

b. "Fraktion A" aus E.coli

"Fraktion A" wurde aus einem Rohextrakt aus E. coli durch fraktionierte Ammonsulfat-Fällung nach dem von Majerus et al. (68) beschriebenen Verfahren gewonnen. Um den Blindwert des ACP-Tests zu verringern, wurde Fraktion A in Anlehnung an die von Elovson und Vagelos (69) beschriebene Methode durch Ionenaustausch-Chromatographie von E.coli-ACP befreit.

Auf eine DEAE-Cellulose-Säule, äquilibriert mit 0,01 M Tris · HCl 0,5 mM EDTA, 0,01 M Thioglycol, pH 7,2, wurde die gegen Startpuffer dialysierte Proteinlösung in einer Konzentration von 5 mg/ml Protein aufgetragen. Nach dem Nachwaschen mit 2 Säulenvolumen 0,05 M LiCl in Puffer wurde Fraktion A durch 3-5 Säulenvolumen 0,25 M LiCl in Puffer eluiert. Pro ml Ionenaustauscher wurden 10 mg Protein aufgetragen.

Die proteinhaltigen Fraktionen wurden auf eine Pufferkonzentration von 0,1 M Triäthanolamin, pH 7,5, gebracht und dann mit Ammonsulfat bis 75 % Sättigung versetzt. Nach Zentrifugation (30 min bei 14 000 g) wurde der Proteinniederschlag in wenig 0,1 M Triäthanolamin HCl/NaOH, 1 mM EDTA, 10 mM Thioglycol, pH 7,5, gelöst und in Anteilen von 1 ml bei -20° C eingefroren

aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde Fraktion A über Nacht gegen 0,02 M K-Phosphat, 0,01 M Thioglycol, 1 mM EDTA, pH 7,0, dialysiert, durch Zentrifugation (20 min bei 27 000 g) von einer Trübung befreit und mit DTT (5 µMol/ml Proteinlsg.) versetzt. Die Lösung wurde bei 0° C aufbewahrt und bis zu 10 Tagen verwendet; in dieser Zeit trat kein Verlust der enzymatischen Aktivität auf.

c. ACP-Bestimmung

Zur Durchführung der ACP-Bestimmung vgl. IV, 1,c; im allgemeinen wurden 2,5 - 3,5 mg Fraktion A zur ACP-Bestimmung eingesetzt.

ACP-Bestimmungen wurden in Abhängigkeit 3-5 verschiedener Konzentrationen des gleichen Präparats durchgeführt (Ausnahme: Austesten von Säuleneluat-Fraktionen).

d. Aktivitätsbestimmungen

Citrat-Synthase nach (180,181), jedoch Start mit Oxalacetat
Cytochrom c-Oxidase durch polarographische Messung des $O_2$-Verbrauchs nach (182,183).

5. Züchtung von Hefe (allgemeine Angaben)

Die Stammhaltung erfolgte auf Schrägagar (Zusammensetzung: 2 % Glucose, 1 % Yeast-Extract, 2 % Bacto-Peptone und 2 % Agar). Im Abstand von 3-6 Wochen wurde überimpft, 24 h bei 30° C bebrütet und dann bei 4° C aufbewahrt.

Inoculum: Von einer 24 h-Kultur auf Schrägagar wurde eine Vorkultur (10-20 ml, gleiche Zusammensetzung wie Hauptkultur) angeimpft und dann 24 h bei komplex zusammengesetzten, bzw. 30 h bei

synthetischen Nährmedien inkubiert. Sie diente als Inoculum.

Wachstumsbedingungen: wenn nicht anders vermerkt, bei 30° C aerob (bis 50 ml in Erlenmeyerkolben, bis 600 ml in Fernbachkolben unter Schütteln; bei größeren Volumen in Kulturflaschen entsprechender Größe unter Durchleiten von Luft (Glasrohr) mit Niax Polyol als Antischaummittel).

Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation geerntet und zweimal durch Resuspendieren in 0,9 % NaCl und Zentrifugieren gewaschen.

Die gezüchtete Hefe wurde in der Regel sofort weiterverarbeitet.

## 6. Versuchsbeschreibungen

### a. Zu Kap. II,3

Acetonpulver aus Hühnerleber (41)

75 g frische Hühnerleber wurde mit 1,5 l Aceton (-10° C) 2 min homogenisiert (Starmix). Das Homogenat wurde abgesaugt, der Rückstand je einmal mit Aceton (-10° C) und Äther (-10° C, peroxidfrei) gewaschen und dann über $P_2O_5$ im Vakuum (Ölpumpe) getrocknet.
Beigemengtes Bindegewebe wurde durch Sieben entfernt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4° C über $P_2O_5$ im Exsikkator. Aus 150 g Leber wurden 19 g Acetonpulver erhalten.

Rohextrakt (45): Acetonpulver wurde im 10fachen Volumen seines Gewichts 0,02 M $KHCO_3$ homogenisiert und zur Extraktion 10 min gerührt (Eisbad). Nach Zentrifugation (10 min bei 40 000 g)

wurde der dunkelrote Extrakt mit etwa dem gleichen Volumen Anionenaustauscheraufschlämmung (Dowex 1 x 10, mit 1 M Tris, pH 8,5, auf pH 8 eingestellt) behandelt. Nach dem Abdekantieren wurde der Vorgang wiederholt. Der Extrakt wurde immer frisch zubereitet.

Seine Aktivität wurde durch Pantothensäurefreisetzung aus CoA (vgl. Abb. 3) überprüft.

Mikrobiologische Pantothensäure-Bestimmung

Lactobacillus plantarum ATCC 8014 diente als Testkeim für die mikrobiologische Pantothensäurebestimmungen. Pantothenate Assay Medium (Difco) wurde hierfür verwendet.

Die Stammhaltung erfolgte in Stichkulturen (Zusammensetzung: 1 % Glucose, 2 % Yeast-Extract, 0,5 % Na-acetat, 1,5 % Agar). Alle 3-4 Wochen wurde überimpft; die Kulturen wurden 30 h bei 37° C bebrütet und dann bei 4° C aufbewahrt.

Inoculum: Von einer Stammkultur, die nicht älter als 1 Woche war, wurden 10 ml Vollmedium (Pantothenat-Konzentration: 100 nM) angeimpft und dann 18-24 h bebrütet. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Zellen in 10 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung suspendiert. 1 ml dieser Zellsuspension wurde zu 100 ml NaCl-Lösung gegeben. Mit jeweils 1 Tropfen wurden die Proben inoculiert.

Durchführung des Tests: Die Reagenzgläser (18 x 180 mm) enthielten 5 ml Testmedium (doppelt konzentriert). In dreifacher Ausführung jeweils wurden steigende Mengen einer Pantothenat-Standardlösung zugegeben; zum anderen Teil enthielten sie die zu testenden Probelösungen in 3 verschiedenen Konzentrationen, jeweils in dreifacher Ausführung. Mit Wasser wurde auf 10 ml

aufgefüllt, 10 min bei 121° C sterilisiert und nach dem Abkühlen inoculiert. Die Proben wurden dann 18-24 h bei 35-37° C bebrütet und zur Unterbrechung des Wachstums auf 0° C abgekühlt. Die Auswertung erfolgte turbidimetrisch bei 578 nm. Dazu wurden die Proben vorher 1:1 mit 0,9 %iger Kochsalzlösung verdünnt.

Abb. 32 zeigt eine Standardkurve, wie sie häufig erhalten wurde. Als Beispiel miteingezeichnet sind die Ergebnisse einer Pantothenat-Bestimmung.

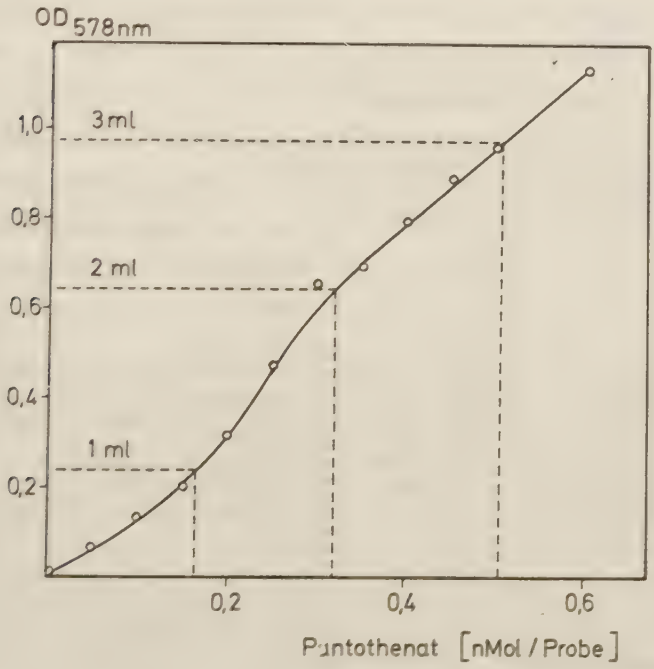



Abb. 32: Mikrobiologische Pantothensäure-Bestimmung mit Lactobacillus plantarum ATCC 8014

Der günstigste Meßbereich liegt zwischen 0,05 und 0,5 nMol Pantothensäure (= 5-50 nM). Es empfiehlt sich, die zugegebenen Mengen der zu testenden Probelösung so zu wählen, daß die 3 Konzentrationen gleichmäßig über den ganzen Meßbereich verteilt sind. Häufig war nämlich eine Depression zu beobachten, wenn alle Konzentrationen der Probe so gewählt waren, daß der Pantothenatgehalt im unteren Teil der Eichkurve lag (etwa zwischen 0,0 und 0,15 nMol Pantothenat/Testansatz): d.h. der gefundene Pantothenatgehalt/ml war bei der höheren Konzentration geringer als bei der kleinsten.

b. Zu Kap. III,2

Hefezucht auf $^{14}$C-Pantothensäure

Zusammensetzung des Mediums (61,62)

In einem Liter waren enthalten:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Glucose | 50 g | L-Asparagin | 1,88 g |
| $KH_2PO_4$ | 0,55 g | L-Histidin | 10 mg |
| KCl | 0,4 g | DL-Methionin | 20 mg |
| $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ | 125 mg | DL-Tryptophan | 20 mg |
| $CaCl_2 \cdot 7\ H_2O$ | 125 mg | Thiamin·HCl | 0,4 mg |
| $MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$ | 2,5 mg | Pyridoxin·HCl | 0,4 mg |
| $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ | 2,5 mg | Niacin | 0,4 mg |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 3,75 g | m-Inosit | 25 mg |
| $K_3$-Citrat $\cdot\ H_2O$ | 5 g | p-Aminobenzoesäure | 0,2 mg |
| Citronensäure·$H_2O$ | 1 g | Biotin | 0,01 mg |

Das sterile pantothenat-freie Nährmedium wurde nach den Angaben von Mücke (61) zusammengestellt oder durch Sterilfiltration erhalten. Nach Zugabe von radioaktiv markierter Pantothensäure (0,8 - 1,2 µMol/l ($8 \cdot 10^6$ Ipm/µMol)) wurden die Proben 30 min sterilisiert (in strömendem Dampf).

Züchtung: 48 h Wachstum; weitere Angaben: s. IX,5
Ausbeute: 10-20 g Hefe (feucht) pro 1 Nährmedium.

Rohextrakt: 25 g Hefe wurden in 25 ml Puffer, pH 7,5 (Zusammensetzung: 0,2 M K-Phosphat, 0,5 M Hydroxylamin, 0,02 M Thioglycol, 2 mM EDTA) suspendiert und mit einem Tropfen Octanol versetzt. Der Aufschluß erfolgte im Zellhomogenisator nach Merkenschlager et al. (63) durch hochtouriges Schütteln für 2 x 45 sec. Eine Füllung enthielt 25 ml Hefesuspension und 40 g Glasperlen (Größe 31/10). Nach dem Abdekantierung wurden die vereinigten Überstände 20 min bei 48 000 g und anschließend 3 h bei 144 000 g zentrifugiert, um einen klaren Rohextrakt zu erhalten.

Der Zusatz von Hydroxylamin zum Aufschlußpuffer war erforderlich, da ohne Hydroxylamin bei der Gelfiltration (vgl. Abb. 6) kein eindeutiger Mittelgipfel gefunden wurde. Wir führen dies auf eine unspezifische Anlagerung von Acyl-CoA an Protein zurück.

c. Zu Kap. IV,2

Anreicherung

Alle Arbeiten wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei 0-4° C durchgeführt.

Bei der Durchführung von Dialysen ist die Verwendung einwandfreier Dialysenmembranen wesentlich. Andernfalls traten Verluste auf, da die Größe des ACP nahe bei der Ausschlußgrenze der Dialysemembranen liegt.

d. Zu Kap. IV,2,a

Aufschluß

6 kg Hefe wurden durch Rühren in 6 l 0,1 M $K_2HPO_4$, 0,02 M Thioglycol, 2 mM EDTA, suspendiert und in einem Manton-Gaulin-Homogenisator (184) bei 500-550 atm dreimal aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde 1 h bei 3 000 g zentrifugiert.

e. Zu Kap. IV,2,b

Hitzedenaturierung von Fremdproteinen

Der trübe Rohextrakt wurde mit Wasser auf 12 l verdünnt und mit 0,6 Mol NaCl, 0,5 Mol Thioglycol und einigen Tropfen Niax Polyol versetzt. Der pH-Wert lag bei 6,2-6,7.

In Anteilen von 4 l wurde der Rohextrakt in einem als Wasserbad dienenden Sterilisator von anfangs 85-90° C unter ständigem Rühren in ca. 15 min auf 80° C erhitzt und 5 min bei dieser Temperatur gehalten. Nach dem Abkühlen im Eisbad wurde denaturiertes Material durch Zentrifugation (1 h bei 3 000 g) entfernt.

f. Zu Kap. IV,2,c

Fällung mit Säure und Ammonsulfat und selektive Extraktion

Die gelb gefärbte Lösung wurde mit 5 N Essigsäure auf pH 4 angesäuert, mit Ammonsulfat bis 95 % Sättigung versetzt, über Nacht gerührt und zentrifugiert (1 h bei 14 000 g). Der Niederschlag wurde in 600-800 ml 0,2 M Na-acetat-Puffer, pH 4,6, suspendiert; mit 2 N NaOH wurde auf pH 4,6 zurückgestellt. Zur gründlichen Extraktion wurde die Suspension in einer Apparatur nach Kunitz und Simms (185) über Nacht gegen 60-80 l 0,2 M Na-Acetat, pH 4,6, dialysiert. Danach wurde 30 min bei 27 000 g zentrifugiert. Der Rückstand wurde mit ca. 300 ml Acetat-Puffer versetzt und durch Rühren (3-5 h) nochmals extrahiert. Die Zentrifugation erfolgte wieder bei 27 000 g für 30 min.

Die vereinigten Extrakte von 2 Anreicherungen (= 12 kg Hefe) wurden, wie beschrieben, bei pH 4 mit Ammonsulfat gefällt. Der Niederschlag wurde in 0,1 M $K_2HPO_4$, 0,01 M Thioglycol, (ca. 400 ml) suspendiert und unter Zugabe von 2 N NaOH bei pH 6-6,5 gelöst. Die Proteinlösung war leicht trüb und wurde bei $-20^{\circ}$ C eingefroren aufbewahrt.

g. Zu Kap. IV,2,d

Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose

Vorbereitung der Probelösung: Die Proteinlösung von 4 Ansätzen (= 24 kg Hefe) wurde gegen 80-100 l 0,01 M K-Phosphat, 0,01 M Thioglycol, pH 6,0, in einer Apparatur nach (185) 16-20 h dialysiert und anschließend mindestens 5 h bei 30 000 g (Rotor 21,

Beckmann) zentrifugiert. Die nun klare Lösung wurde mit Puffer auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml verdünnt. Durchführung der Chromatographie: vgl. Abb. 11; pro ml Ionenaustauscher wurden 15-20 mg Protein aufgetragen.

h. Zu Kap. IV,2,e

Gelfiltration an Sephadex G 75

Vorbereitung der Probelösung: Die vereinigten, ACP-haltigen Fraktionen wurden durch Gefriertrocknung auf ca. 1/10 des ursprünglichen Volumens eingeengt. Durch Dialyse gegen 0,02 M K - Phosphat, 0,01 M Thioglycol, pH 6,0, (mindestens 5 h) wurde der NaCl-Gehalt erniedrigt. Durch Lyophilisieren wurde die Probe auf 10-12 ml eingeengt und durch Unterschichten auf die Säule aufgetragen. Durchführung der Gelfiltration: vgl. Abb. 12.

i. Zu Kap. IV,2,f

Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wurde in einer 110 ml-LKB-Apparatur nach der Vorschrift des Herstellers (186) durchgeführt. Die Anode befand sich unten, die Kathode oben. Als Anodenflüssigkeit wurde Phosphorsäure (0,24 ml 85 %ige $H_2PO_4$, 14,4 g Saccharose und 16,8 ml $H_2O$), als Kathodenflüssigkeit Äthanolamin (2 %) verwendet. Die "schwere" Lösung enthielt im Volumen von 50 ml: 24,4 g Saccharose, 50 mg Brij 58, 0,035 ml Thioglycol und 2,1 ml 40 %ige Ampholine-Lösung, pH 3-5. Die "leichte" Lösung enthielt in 50 ml: die Probelösung (bis zu 20 mg Protein), 50 mg Brij 58, 0,035 ml Thioglycol und 0,7 ml 40 %ige Ampholine-Lösung, pH 3-5. Eine evtl. auftretende Trübung der "leichten" Lösung wurde durch

Zentrifugation entfernt; sie hatte keinen Einfluß auf die ACP-Aktivität.

Die Säule wurde mit Wasser von 4° C gekühlt. Bei abnehmender Stromstärke wurde die Spannung in dem Maße erhöht, daß 2 Watt nicht überschritten wurden. Die Folkussierung wurde beendet, als die Stromstärke bei konstanter Spannung über mindestens 12 h nicht mehr abnahm. Weitere Angaben: vgl. Abb. 13.

ACP-haltige Fraktionen wurden vereinigt und durch Dialyse gegen 0,05 M K-Phosphat, 0,01 M Thioglycol, pH 6,5, und - nach Einengen durch Gefriertrocknung - Gelfiltration über eine kleine Sephadex G 25-Säule, die mit dem gleichen Puffer äquilibriert war, von Ampholine und Saccharose befreit.

j. Zu Kap. IV,2,g

Präparative Disk-Elektrophorese

Die präparative Disk-Elektrophorese erfolgte im Gelelektrophoresegerät "UltraPhor" (Colora) nach den Angaben der Bedienungsanleitung (187) in einer 7 mm-Trennkammer mit geringen Modifikationen.

Zusammensetzung des Trenngels: 7,5 % Acrylamid, 0,1 % N,N'-Methylenbisacrylamid. Die Polymerisation erfolgte bei 5-6° C.

Zusammensetzung des Sammelgels: 2,75 % Acrylamid, 0,7 % N,N'-Methylenbisacrylamid. Dieses wurde photopolymerisiert.

Aufbau der Gelkammer:

Höhe des Trenngels: 4,6 cm; Höhe des Sammelgels: 6 cm, in das eine Tasche von 4 cm Tiefe zur Aufnahme der Probelösung hineinreichte. Verwendet wurde das von Maurer (77) als System 1 be-

zeichnete Puffersystem. Elutionspuffer: Tris·HCl, 0,125 M, pH 8,1, 0,01 M Thioglycol; Gegenkammerpuffer: Tris·HCl 0,375 M, pH 8,1, 0,01 M Thioglycol; beide Puffer wurden vor Gebrauch entgast. Die Durchflußgeschwindigkeit des Elutionspuffers betrug 30 ml/h, die des Gegenkammerpuffers 45 ml/h.

Vorbereitung der Proteinlösung: Die Probe wurde 6 h gegen Sammelgel-Puffer (1:8 verdünnt; Zusammensetzung: 0,5 M Tris·HCl, pH 6,7) dialysiert, mit Glycerin (Endkonzentration: 15 %) und einigen Tropfen Bromphenolblau versetzt.

Durchführung der Elektrophorese: Temp.: 8° C; während der ersten 4 Stunden betrug die Leistung 15-20 Watt (bei 200-300 V), bis die Probe etwa 0,5 cm weit in das Trenngel eingewandert war, danach 45 Watt (bei 500 V).

Die ACP-haltigen Fraktionen wurden gegen 0,05 M K-Phosphat, pH 6,8, 0,01 M Thioglycol dialysiert, durch Lyophilisieren eingeengt und nochmals gegen Phosphatpuffer dialysiert.

k. Zu Kap. IV,6

Isolierung des ACP aus E.coli

Der bei der Bereitung von "Fraktion A" (vgl.IX,4,b) erhaltene Überstand der Ammonsulfat-Fällung (75 % gesättigt) wurde mit 6 N HCl auf pH 1 angesäuert (68) und nach 15 min zentrifugiert (1 h, 3 000 g). Der Niederschlag wurde in 0,1 M $K_2HPO_4$, 0,02 M Thioglycol, suspendiert und mit 2 N NaOH bei pH 7 gehalten. Nach 1 h wurde die Suspension zentrifugiert (30 min bei 35 000 g). Der hierbei erhaltene Überstand wurde in 2 Anteilen durch Gelfiltration an Sephadex G 75 (Säule 5 x 79 cm), äquilibriert in

0,02 M K-Phosphat, pH 6,2, 0,01 M Thioglycol, weiter gereinigt (vgl. Legende zu Abb. 12). Die ACP-haltigen Fraktionen der Gelchromatographie (435 mg Protein von 2 Läufen) wurden auf das doppelte Volumen verdünnt und auf DEAE-Cellulose-Säule (V = 200 ml), äquilibriert in 0,01 M K-Phosphat, pH 6,2, 0,01 M Thioglycol, aufgetragen. Die Elution erfolgte durch einen linearen NaCl-Gradienten (0,1-0,55 M in insgesamt 4,8 l Puffer). Die ACP-haltigen Fraktionen wurden durch Lyophilisieren eingeengt, durch Zentrifugation von einer Trübung befreit und eingefroren aufbewahrt (72 mg Protein). 15 mg, durch Gelfiltration über Sephadex G 25 in 1% Glycin, 0,01 M Thioglycol, entsalzt, wurden mit Ampholine, pH 3-5, der isoelektrischen Fokussierungunterworfen (Versuchsbedingungen vgl. IX,b,i ). Hierdurch wurden 7,5 mg reines ACP erhalten.

1. Zu Kap. V,2

Aminosäureanalyse

Die Probe wurde nach Gelfiltration über Sephadex G 25, äquilibriert in Pyridin-Acetat-Puffer, pH 6,5 (Pyridin/Eisessig/$H_2O$ = 10/0,4/90), lyophilisiert, in Wasser aufgenommen - entsprechend 0,2 - 0,5 mg Protein - in dickwandige Zentrifugengläser überführt und am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht.

Die Proteinhydrolyse erfolgte nach Moore und Stein (80): die Proben wurden in 1 ml 5,7 N HCl (konz. HCl 1:1 mit Wasser verdünnt, über $SnCl_2$ bei Normaldruck zweimal destilliert und in einer dunklen Flasche unter Zusatz einiger Kirstalle Phenol aufbewahrt) gelöst. Die Gläser wurden verengt, unter Vakuum

(Ölpumpe) in Aceton-Trockeneis eingefroren, vorsichtig beim Raumtemperatur wieder aufgetaut und dann abgeschmolzen. Hydrolysebedingungen: 24-72 h bei 110° C. Nach dem Abkühlen wurden die Gläser kurz zentrifugiert. Ihr Inhalt wurde am Rotationsverdampfer (Badtemp. 40° C) zur Trockne gebracht; der Rückstand wurde dreimal in 1 ml $H_2O$ wieder aufgenommen und erneut zur Trockne gebracht.

Das Proteinhydrolysat wurde in einem definiertem Volumen Probenpuffer, pH 2,2 (188) aufgenommen und der automatischen Aminosäureanalyse unterworfen.

Perameisensäure-Oxidation (81)

Perameisensäure wurde nach (38) hergestellt: Eine Mischung von Ameisensäure/$H_2O_2$/$H_2O$ = 8:1:1 wurde 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Probe wurde anschließend 4 h in der gebildeten PAS inkubiert bei 0° C. Das Reagenz wurde dann am Rotationsverdampfer entfernt; der Rückstand wurde zweimal in Wasser aufgenommen und am Rotationsverdampfer wieder zur Trockne gebracht.

m. Zu Kap. V,3

Thiol-Bestimmung mit DTNB

Probenvorbereitung: ACP wurde über eine mit Pyridin-Acetat-Puffer, pH 6,5, (Pyridin/Eisessig/Wasser = 10/0,4/90) äquilibrierte Sephadex G 25-Säule filtriert. Das proteinhaltige Eluat wurde lyophilisiert, in 0,2 M Tris·HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 20 mM DTT, gelöst und 60 min bei Raumtemperatur verschlossen stehen gelassen. Danach wurde DTT durch Gelfiltration an Sephadex G 25

(fine) in 0,05 M K-Phosphat, pH 6,8, 1 mM EDTA, von Protein abgetrennt.

Die Thiol-Bestimmung erfolgte in Anlehnung an (84,167); in 1 ml waren enthalten: 100 µMol K-Phosphat, pH 6,8, 100 nMol EDTA, 1 µMol DTNB (pH 6,8) und Protein, wie in Tab. 8 angegeben.

Die Extinktion bei 405 nm wurde sofort gemessen; sie zeigte keine zeitliche Änderung. Zusatz von 0,1 ml 10 % SDS zu Probe und Blindwert ergab unveränderte Ergebnisse.

n. Zu Kap. V,4

Nachweis von Serin als Bindungsstelle der prosthetischen Gruppe

0,3 mg $^{14}$C-ACP (4 200 Ipm/mg) wurden nach Gefriertrocknung in 0,5 ml 0,1 N NaOH aufgenommen, 30 min bei 70° C inkubiert und dann neutralisiert. Nach Zugabe von TCE (Endkonzentration: 0,5 M) wurde über Nacht stehen gelassen und zentrifugiert. Der Niederschlag wird einmal mit 0,3 M TCE gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden mit festem $KHCO_3$ neutralisiert; der Niederschlag wurde in 0,02 %iger $KHCO_3$-Lösg. suspendiert. Nach Zugabe von Instagel wurde der Radioaktivitätsgehalt bestimmt. Niederschlag: 30 Ipm; Überstand: 1 500 Ipm. (inkl. Blindwert).

Eine weitere Probe (0,4 mg), die der Alkalibehandlung unterworfen worden war, wurde nach salzsaurer Hydrolyse nach den Angaben von Oesterhelt (38) mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin versetzt: Das Hydrolysat wurde mit 2 ml 1 %igem Dinitrophenylhydrazin in 2 N HCl versetzt und dann über Nacht stehen gelassen. Die Lösung wurde fünfmal mit Essigester extrahiert; die vereinigten Extrakte - nach Waschen mit Wasser- wurden fünfmal mit 10 %iger $Na_2CO_3$ extrahiert. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Essigester ge-

waschen und nach dem Ansäuern erneut viermal mit Essigester extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Äthanol aufgenommen.

Die Papierchromatographie erfolgte absteigend auf Whatman I mit wassergesättigtem n-Butanol als Laufmittel. Als Referenzsubstanzen dienten die 2,4-Dinitrophenylhydrazon-Derivate von Brenztraubensäure und $\alpha$-Ketobuttersäure.

o. Zu Kap. VI,1

Hefesphäroplasten und Aufschluß

Hefezucht (vgl. allgemeine Angaben, IX,5 ).
Verwendeter Hefestamm: Saccharomyces carlsbergensis ATCC 9080
Zusammensetzung des Mediums: 2 % Glucose, 1 % Yeast-Extrakt, 2 % Bacto-Peptone; Wachstumsbedingungen: aerob, 15-20 h bei 30° C. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation (30 min bei 3 000 g, 4° C) geerntet, zweimal mit Wasser und danach mit Tris-Puffer (0,02 M, pH 7,5) gewaschen.

Vorbehandlung mit Thioglycol und EDTA erfolgte 30 min bei 30° C unter Schütteln in Anlehnung an (93) in 0,04 M EDTA, 1 % Thioglycol (v/v), pH 7,0: 2,5 ml/g Hefe. Danach wurde die Hefe abzentrifugiert und zweimal mit 1,5 M Sorbit gewaschen.

Inkubation mit "Helicase" (97): Die Hefezellen wurden in Inkubationspuffer (Zusammensetzung: 1,35 M Sorbit, 1 mM EDTA, Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,8) suspendiert (2,5 ml/g Hefe). Dazu wurde "Helicase" (Lyophilisat in Inkubationspuffer gelöst) gegeben (30-50 mg/ml Protein). Die Inkubationszeit betrug bis zu

2 h (30° C, unter Schütteln).

Messung der Sphäroplastenbildung: s. Legende zu Abb. 16

Die gebildeten Sphäroplasten wurden abzentrifugiert (10 min bei 5 000 g), zweimal mit 1,5 M Sorbit und abschließend einmal mit 0,75 M Sorbit, 0,4 M Mannit, 0,1 % Serumalbumin, pH 7, gewaschen.

Aufschluß (9%): Zum Aufschluß wurden die Sphäroplasten in 0,6 M Mannit, 2 mM EDTA, 0,1 % Serumalbumin, pH 7, suspendiert (ca. 4 ml/g Sphäroplasten) und in Anteilen in einem Glashomogenisator (nach Dounce) von Hand homogenisiert.

p. Zu Kap. VI,2

Fraktionierte Zentrifugation (vgl. Abb. 17)

Das Homogenat wurde 10 min bei 1 000 g zentrifugiert. Das Sediment (Zellkern-Fraktion) wurde durch Resuspendieren und Zentrifugation (10 min, 1 000 g) gewaschen.

Die vereinigten Überstände wurden 10 min bei 10 000 g zentrifugiert. Das Sediment dieses Zentrifugationsschrittes wurde in Puffer suspendiert, zuerst 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Der hierbei erhaltene Rückstand wurde der Zellkern-Fraktion zugefügt. Die überstehende Lösung wurde 10 min bei 10 000 g zentrifugiert (Niederschlag: Mitochondrien-Fraktion).

Die weitere Aufarbeitung erfolgte, wie in Abb. 17 angegeben.

Die Sedimente (Zellkern-, Mitochondrien-, Submitochondrien- und Microsomen-Fraktion) wurden in 0,05 M K-Phosphat pH 6,5 suspendiert (Proteinkonzentration: 10 mg/ml).

q. Zu Kap. VI,4

Zu Tab. 10

Zusammensetzung des Nährmediums: Außer den in Tab. 10 aufgeführten Komponenten enthielten die Ansätze noch folgende Bestandteile (Angaben pro l): 10 g YeastExtrakt, 5 g Peptone, 9 g $KH_2PO_4$, 6 g $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0,6 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$.

Zur Durchführung der ACP-Bestimmung (Aufschluß, Hitzedenaturierung, Säure- und Ammonsulfat-Fällung und der ACP-Bestimmung): s. Legende zu Abb. 8, S.26 .

Reinigung der Mitochondrien

Die durch fraktionierte Zentrifugation erhaltene mitochondrien-Fraktion (vgl. VI, 1+2), suspendiert in 0,6 M Mannit, wurde auf einen linearen Dichtegradienten, der aus 16 ml 50 % und 18 ml 30 % (g/g) Saccharose in 0,02 M Tris·HCl, pH 7,4, hergestellt worden war, gegeben (5 ml/Zentrifugenröhrchen) und anschließend 3 h bei 26 500 Upm zentrifugiert (SW 27-Rotor, Beckman). Nach beendetem Lauf wurde zuerst die sich über der Mitochondrienbande sich befindende Lösung sorgfältig entfernt (mit Hilfe einer Pipette, deren Spitze einen Winkel von $90^{\circ}$ C bildete); mit dem gleichen Hilfsmittel wurden anschließend die Mitochondrien gewonnen, die danach mit gepufferter 0,25 M Saccharose auf das 4-6-fache Volumen verdünnt wurden (über Nacht). Durch Zentrifugation wurden die Mitochondrien als Sediment erhalten.

Die gereinigten Mitochondrien wurden entweder sofort weiterverarbeitet (VII,6) oder als Sediment bzw. Homogenat eingefroren aufbewahrt.

Mitochondrien-Homogenat und -Extrakt

Mitochondriensediment wurde in 0,05 M K-Phosphat, pH 7, 1 mM EDTA, suspendiert (Proteinkonz.: 5-10 mg/ml), mit einem Glaskugelplümper (nach Dounce) gründlich homogenisiert und gegebenenfalls mit Ultraschall behandelt:(= Homogenat). Durch Zentrifugation (20-30 min bei 100 000 g) wurden Membranbestandteile von den löslichen Anteilen (= Extrakt) getrennt.

r. Zu Kap. VI,2

Zusammensetzung der Medien für die Hefezucht (Angaben/l):

10 g Yeast-Extrakt, 5 g Peptone, 9 g $KH_2PO_4$, 6 g $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0,6 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, entweder 10 g Glucose oder 30 ml Glycerin (87 %).

Die Aufarbeitung der Hefe (Protoplastenbildung, Aufschluß, Gewinnung der Mitochondrienfraktion) erfolgte wie in VI, 1+2 beschrieben.

s. Zu Kap. VII,3

Radiochemischer FS-Synthetase-Test (121)

Ein Ansatz enthielt in 0,5 ml Gesamtvolumen: 50 µMol K-Phosphat, pH 7,0, 2,5 µMol DTT, 0,6 mg Serumalbumin, 10 µg Rotenon, 10 nMol Acyl-CoA, 20 nMol 2-$^{14}$C-Malonyl-CoA (1-3 µC/µMol), 0,5 µMol NADH, 0,5 µMol NADPH und mitochondriales Protein.

Die Ansätze wurden mit einem $N_2$-Strom gespült. Gestartet wurde im allgemeinen durch Zugabe von mitochondrialem Protein. Die Inkubation erfolgte im verschlossenen Gefäß bei 30° C. Durch Einsetzen in ein Eisbad und Zugabe von 0,5 ml 10 %iger

methanolischer KOH wurde die Reaktion beendet. Nach Zusatz von je 2 µMol Palmitin- und Stearinsäure als Träger wurde der Ansatz durch Rückflußkochen auf dem Wasserbad für 30 min verseift. Die alkalische Lösung wurde zweimal mit je 3 ml Petroläther (50-70) extrahiert. Nach dem Ansäuern mit 0,5 ml 12 N $H_2SO_4$ wurde die Lösung viermal mit je 3 ml Petroläther extrahiert. Die vereinigten Petrolätherextrakte wurden einmal mit 3 ml 3 M Essigsäure und danach dreimal mit je 3 ml Wasser gewaschen. Nach Verdampfen des Lösungsmittels (im Szintillationsfläschchen unter leichtem Luftstrom) wurde der Rückstand in Szintillationslösung aufgenommen und seine Radioaktivität bestimmt.

Zu Tab. 12

Eingefrorene Mitochondrien wurden in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, (ohne osmotische Stabilisierung) suspendiert und homogenisiert (Homogenisator nach Dounce): 7,5 mg/ml Protein.

Ansatz 2b wurde für 4 x 15 sec mit Ultraschall behandelt(Eisbad). Ansatz 3: zum Mitochondrien-Homogenat wurde Digitonin gegeben (Endkonz.: 0,3 mg/mg Protein). Anschließend wurde der Ansatz 15 sec. lang mit Ultraschall behandelt und schließlich 20 min im Eisbad gerührt.

Die Ansätze wurden jeweils 15 min bei 80 000 g zentrifugiert. Die hierbei erhaltenen Niederschläge wurden jeweils im gleichen Volumen Puffer (0,1 M, pH 7,0) resuspendiert, das die Ausgangssuspension hatte.

Die FSS-Aktivitätsteste wurden jeweils mit 0,1 ml durchgeführt.

s. Zu Kap. VII,6

Immuno-Elektrophorese (IEP):

Die Immuno-Elektrophorese wurde nach der Angabe von Grabar (123) in einer feuchten Immun-Elektrophoresekammer durchgeführt (Agarosekonzentration 1 % Agarose, 0,05 M K-Phosphat, pH 7,1, 0,02 % Na-Azid, Elektrodenpuffer 0,05 M K-Phosphat, pH 7,1). Die Elektrophorese wurde mit 6 mA pro Objektträger über 1,5 h bei 12° C durchgeführt. Nach Zugabe des Antiserums und einer Diffusionszeit von 24-72 h wurde zuvor präzipitiertes Protein mit 0,1 M K-Phosphat, pH 8,1, 0,02 % Na-Azid, ausgewaschen. Nach Trocknen des Gels wurde dieses mit Coomassie-Färbelösung angefärbt und entfärbt (s.IX,2,d).

s. Zu Kap. VII,6

Markierung mit $^{14}$C-Palmitinsäure

Zusammensetzung des Mediums s. VIII,2,b, jedoch wurde Glucose durch Lysoria (1 %) ersetzt und enthielt zusätzlich noch 10 g/l Casein-Cyclo-Yeast (Vitamin-frei).

Ansatz nach 48 h Wachstum 5 g Hefe (feucht)/l Medium

In einer den oben angegebenen Bedingungen nur 10 % der zugegebenen $^{14}$C-Palmitinsäure eingebaut worden war, wurde das zellfreie Zentrifugat mit Glucose (Endkonzentration 1,2 %) versetzt, mit KOH auf pH 8,1 eingestellt, 30 min im strömenden Dampf sterilisiert und nach dem Erkalten normale für 52 h bebrütet. Ausbeute: 10 g Hefe/l Medium.

Die geerntete Hefe wurde jeweils sofort weiter aufgearbeitet, wie in VIII,6,r beschrieben.

Trennung der inneren und äußeren Mitochondrienmembran nach Sottocasa et al. (120).

Diese Versuche wurden sofort im Anschluß an die Reinigung der Mitochondrien durchgeführt.
Schwellen und Kontraktion sowie Behandlung mit Ultraschall erfolgten genau nach den Angaben in (120); die Auftrennung wurde in einem diskontinuierlichen Dichtegradienten in einem SW-27-Rotor (Beckman) vorgenommen.

Aufbau des Gradienten:

a) (vgl. Abb. 27) 14 ml 1,32 M Saccharose, 7 ml 1,0 M Saccharose, 7 ml 0,76 M Saccharose in 0,01 M Tris-Phosphat, pH 7,5; Auftrag: 10 ml Probe in 0,45 M Saccharose

b) (vgl. Abb. 29) 12 ml 1,32 M und 6 ml 0,76 M Saccharose in 0,01 M Tris-Phosphat, pH 7,5; Auftrag: 20 ml Probe in 0,45 M Saccharose.

Zentrifugation: 3 h bei 25 000 Upm.
Nach beendetem Lauf wurden die Gradienten von oben mit Hilfe einer Pipette fraktioniert, deren Spitze im Winkel von 90 $^{o}$ abgebogen worden war.

## X. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Bestimmung des 4'-Phosphopantetheingehalts der Fettsäuresynthetase aus Hefe wurde die prosthetische Gruppe durch Alkalibehandlung abgespalten, enzymatisch weiter zu Pantothensäure abgebaut und diese sodann mikrobiologisch bestimmt. Zur Erfassung des durch die Alkalieinwirkung zerstörten Vitaminanteils wurden geeignete Korrekturverfahren ermittelt. Bei zwei reinen FSS-Präparaten wurden unabhängig voneinander als Mittelwert von jeweils 8 Bestimmungen 4,9 bzw. 5,0 Pantetheinreste (und somit ACP-Komponenten) pro FSS-Molekel gefunden.

Bei Fraktionierung eines Rohextrakts aus Hefezellen, die unter Zusatz von $^{14}$C-Pantothensäure gezüchtet worden waren, durch Gelfiltration fanden wir zusätzlich zu den bekannten pantothensäurehaltigen Zellbestandteilen Coenzym A und Fettsäuresynthetase eine weitere, bislang unbekannte pantothenathaltige Komponente, für die sich ein Molekulargewicht von etwas über 13 000 Dalton abschätzen ließ. Die Substanz konnte das E.coli-ACP in dem mit E.coli-Enzymen durchgeführten Malonyl-CoA/$^{14}CO_2$-Austauschtest vertreten und stellt somit ein neben der in den FSS-Komplex integrierten ACP-Funktion in der Hefezelle vorkommendes freies ACP dar.

Für dieses freie Hefe-ACP wurde ein Anreicherungsverfahren ausgearbeitet, das in sechs bis sieben Schritten zu reinen Präparaten führt; bei einer Ausbeute zwischen 20 und 40 % war die Anreicherung hierbei etwa 2 800 fach (bezogen auf die erste Bestimmungsmöglichkeit). Die Coenzymaktivität des Hefe-ACP im Austauschtest betrug 1,4-1,8 E/mg (E.coli-ACP: 2,4-6,9 E/mg; ACP aus Spinatblättern:

0,14 E/mg).

Ein Vergleich der molekularen Eigenschaften, die als charakteristisch für Acyl Carrier Proteine anzusehen sind, zeigte eine weitgehende Ähnlichkeit des Hefe-ACP mit ACProteinen aus anderen Organismen. Das Molekulargewicht des Proteins beträgt ca. 14 000 Dalton; es enthält einen 4'-Phosphopantetheinrest als prosthetische Gruppe, der an einen Serinrest gebunden ist. Die sauren Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure stellen die in der Polypeptidkette am häufigsten vertretenen Bausteine dar; der isoelektrische Punkt des Hefe-ACP (bzw. E.coli-ACP) liegt bei pH 4,15 (bzw. 3,8).

Durch Aufschluß von Hefesphäroplasten unter milden Bedingungen und fraktionierte Zentrifugation wurde die Lokalisierung des ACP in der Hefezelle in den Mitochondrien nachgewiesen. Untersuchung des ACP-Gehalts der Hefe unter verschiedenen Zuchtbedingungen zeigte, daß der höchste Gehalt bei Züchtung unter aeroben Bedingungen in Gegenwart geringer Glucosekonzentrationen gefunden wurde; Sauerstoffentzug und hohe Glucosekonzentrationen ("Glucose-Repression") bewirkten eine Verringerung des ACP-Gehalts um ein Drittel. Zusatz von Chloramphenicol zum Zuchtmedium führte zu keiner Hemmung der Biosynthese des ACP.

Die Frage nach der biologischen Funktion des freien Hefe-ACP muß vorerst offenbleiben. Wir konnten in Hefe-Mitochondrien zwei Fettsäuren-synthetisierende Prozesse nachweisen: ein de novo-synthetisierendes System, das Acetyl-CoA als Starter verwendet, sowie ein kettenverlängerndes, das Myristyl-CoA als Substrat be-

vorzugt; beide Systeme benötigen zwar Malonyl-CoA, sind jedoch in ihrer enzymatischen Aktivität nicht auf einen Zusatz von ACP angewiesen.

Antiseren gegen den cytoplasmatischen FSS-Komplex zeigten keine Wirkung auf die Aktivität der Kettenverlängerung, übten jedoch eine Hemmwirkung auf das de novo-synthetisierende System aus. Da mit Hilfe der Immunelektrophorese die Anwesenheit cytoplasmatischer FSS ausgeschlossen wurde, kann das Vorliegen einer immunologischen Kreuzreaktion als Erklärung für diesen Befund angesehen werden.

Orientierende Versuche zur submitochondrialen Lokalisierung nach der Methode von Sottocasa et al. (120) weisen darauf hin, daß ACP und die beiden mitochondrialen fettsäuren-synthetisierenden Systeme verschiedenen mitochondrialen Kompartimenten zuzuordnen sind und bestätigen somit, daß das freie ACP an diesen Syntheseprozessen nicht beteiligt ist. Die Ergebnisse zeigten ferner, daß das ACP nicht das einzige pantothensäurehaltige Protein der Hefemitochondrien darstellt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Williams, R.J. (1943). Adv. Enzymol. 3, 253
2. Lipmann, F., Kaplan, N.O., Novelli, G.D., Tuttle, L.C. und Guirard, B.M. (1947). J. Biol. Chem. 167, 869
3. Dimroth, P., Greull, G., Seyffert, R. und Lynen, F. (1972). Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 353, 126
4. Buckel, W., Buschmeier, V. und Eggerer, H. (1971). Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 352, 1195
5. Buckel, W. und Bobi, A. (1976). Eur. J. Biochem. 64, 255
6. Gilhuus-Moe, C.C., Kristensen, T., Bredesen, J.E., Zimmer, T.L. und Laland, S.G. (1970). FEBS-Letters 7, 287
7. Lipmann, F., Gevers, W., Kleinkauf, H. und Roskoski, R., Jr. (1971). Adv. Enzymol. 35, 1
8. Frøgshov, O. (1975). Eur. J. Biochem. 59, 201
9. Ailhaud, G.P., Vagelos, P.R. und Goldfine, H. (1967). J. Biol. Chem. 242, 4459
10. Majerus, P.W., Alberts, A.W. und Vagelos, P.R. (1965). Proc. Natl. Ac. Sci. U.S. 53, 410
11. Majerus, P.W., Alberts, A.W. und Vagelos, P.R. (1965). J. Biol. Chem. 240, 4723
12. Pugh, E.L. and Wakil, S.J. (1965). J. Biol. Chem. 240, 4727
13. Simoni, R.D., Criddle, R.S. and Stumpf, P.K. (1967). J. Biol. Chem. 242, 573
14. Wells, W.W., Schultz, J. and Lynen, F. (1966). Proc. Natl. Ac. Sci. U.S. 56, 633
15. Wells, W.W., Schultz, J. and Lynen, F. (1967). Biochem. Z. 346, 474
16. Lynen, F. (1967). Biochem. J. 102, 381
17. Schweizer, E., Piccinini, F., Duba, C., Günther, S. und Lynen, F. (1970). Eur. J. Biochem. 15, 483
18. Williamson, I.P., Goldman, J.K. and Wakil, S.J. (1966). Fed. Proc. 25, 340
19. Jacob, E.J., Butterworth, P.H.W. and Porter, J.W. (1968). Archiv. Biochem. Biophys. 124, 392

20. Burton, D.N., Haavik, A.G. and Porter, J.W. (1968). Archiv. Biochem. Biophys. 126, 141
21. Smith, S. and Abraham, S. (1970). J. Biol. Chem. 245, 3209
22. Brindley, D.N., Matsumura, S. und Bloch, K. (1969). Nature 224, 666
23. Matsumura, S., Brindley, D.N. und Bloch, K. (1970). Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 369
24. Delo, J., Ernst-Fonberg, M.L. und Bloch, K. (1971). Arch. Biochem. Biophys. 143, 385
25. Goldberg, I. und Bloch, K. (1972). J. Biol. Chem. 247, 7349
26. Elovson, J. (1975). J. Bact. 124, 524
27. Lynen, F. (1961). Fed. Proc. 20, 941
28. Vagelos, P.R., Majerus, P.W., Alberts, A.W., Larrabee, A.R. and Ailhaud, G.P. (1966). Fed. Proc. 25, 1485
29. Majerus, P.A., Alberts, A.W. and Vagelos, P.R. (1964) Proc. Natl. Ac. Sci. U.S. 51, 1231
30. Ginsburg, A. and Stadtman, E.R. (1970). Ann Rev. Biochem. 39, 429
31. Reed, L.J. and Cox, D.J. (1970) in: The Enzymes (Boyer, P. D., edt.), 3rd edition, Vol. 1, S. 213
32. Henning, U., Herz, C. und Szolyvay, K. (1964). Z. Vererbungslehre 95, 236
33. Reed, L.J. and Oliver, R.M. (1968). Brookhaven Symp. Biol. 21, 397
34. Schweizer, E., Willecke, K., Winnewisser, W. and Lynen, F. (1970). Vitamins and Hormones 28, 329
35. Lynen, F., Oesterhelt, D., Schweizer, E. and Willecke, K. (1968). In: Cellular Compartmentalization and Control of Fatty Acid Metabolism (Gran, F.C., edt.), S. 1, Universitetsforlaget, Oslo
36. Ayling, J., Pirson, R. and Lynen, F. (1972). Eur. J. Biochem. 7, 526
37. Schweizer, E., Lerch, I., Kröplin-Rueff, L. and Lynen F. (1970). Eur. J. Biochem. 15, 472
38. Oesterhelt, D. (1967). Diss. Universität München
39. Kavanagh, F. (Edt.) (1963) Analytical Microbiology S. 509, Acad. Press, New York

40. Willecke, K. (1968). Diss. Univ. München
41. Novelli, G.D., Kaplan, N.O. and Lipmann, F. (1949). J. Biol. Chem. 177, 97
42. Stadtman, E.R. (1955). Meth. Enzymol. 1, 596
43. Decker, K. (1959). Die Aktivierte Essigsäure. F. Enke, Stuttgart
44. Novelli, G.D. (1957). Meth. Enzymol. 3, 917
45. Novelli, G.D. und Schmetz, F.J. (1951). J. Biol. Chem. 192, 181
46. Lynen, F. (1962). Proc. R.A. Welch Found. Conf. on Chem. Res. 5, 293, Houston, Texas
47. Pilz, I., Herbst, M., Kratky, O., Oesterhelt, D. and Lynen, F. (1970). Eur. J. Biochem. 13, 55
48. Campbell, R.C. (1971). Statistische Methoden für Biologie und Medizin. G. Thieme-Verlag, Stuttgart
49. Haseloff, O.W. and Hoffmann, H.-J. (1970). Kleines Lehrbuch der Statistik. de Gruyter, Berlin
50. Oesterhelt, D., Bauer, H. and Lynen, F. (1969). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 63, 1377
51. Ziegenhorn, J. (1970). Diss. Universität München
52. Schweizer, E., Kniep, B., Castorph, H. and Holzner, U. (1973). Eur. J. Biochem. 39, 353
53. Schweizer, E., Holzner, U., Meyer, K.-H., Tauro, P. and Schweizer, M. (1974). In: Comparative Biochemistry and Physiology of Transport (Bolis, L., Bloch, K., Luria, S.E. and Lynen, F., edts.), S. 219, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam
54. Darnau, E.W. and Klotz, I.M. (1975). Arch. Biochem. Biophys. 166, 651
55. Hagen, A. and Hofschneider, P.H. (1964). 3rd Eur. Reg. Conf. on Electron Microscopy, S. 69
56. Schweizer, E., Oesterhelt, D., Chan, W., Dubi, Ch. and Lynen, F. (1966). In: Lipoide, 16. Coll. d. Ges. f. physiol. Chem. (Schütte E., edt.), Springer-Verl., Berlin-Heidelberg, New York, 49
57. Lynen, F. (1967). In: Progr. Biochem. Pharmacol. (Kritchevsky, D., Paoletti, R., and Steinberg, D., edts.). Vol. 3, 1, S. Karger-Verl., Basel-New York

58. Willecke, K., E. Ritter und F. Lynen (1969). Eur. J. Biochem. 8, 503
59. Majerus, P.W. and Vagelos, P.R. (1967). Adv. Lipid Res. 5, 1
60. Prescott, D.J. and Vagelos, P.R. (1972). Adv. Enzymol. 36, 269
61. Mücke, D., Einführung in die mikrobiologische Bestimmungsverfahren. VEB G. Thieme, Leipzig 1955, 86
62. Difco Manual. Difco Laboratories Inc., (1953), Detroit 1
63. Merkenschlager, M., Schlossmann, K. und Kurz, W. (1957). Biochem. Z. 329, 332
64. Sephadex-Gel Filtration in Theory and Practive (1971). Firmenschrift Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala
65. DiNello, R.K. and Ernst-Fonberg, M.L. (1973). J. Biol. Chem. 248, 1707
66. Alberts, A.W., Goldman, R. and Vagelos, P.R. (1963). J. Biol. Chem. 238, 557
67. Alberts, A.W., Majerus, P.W. and Vagelos, P.R. (1965). Biochem. 4, 2265
68. Majerus, P.W., Alberts, A.W. and Vagelos, P.R. (1968). Biochem. Prep. 12, 56
69. Elovson, J. and Vagelos, P.R. (1968). J. Biol. Chem. 243, 3603
70. Alberts, A.W., Majerus, P.W. and Vagelos, P.R. (1969). Meth. Enzym. 14, 57
71. Vagelos, P.R. and Alberts, A.W. (1960). J. Biol. Chem. 235, 2786
72. Lynen, F. (1960). Sitzungsber. d. Bayer. Akad. d. Wiss., Math.-Nat. Klasse, S. 8
73. Lynen, F., Hopper-Kessel, I. and Eggerer, H. (1964). Biochem. Z. 340, 95
74. Majerus, P.W., Alberts, A.W. and Vagelos, P.R. (1969). Meth. Enzym. 14, 84
75. Haglund, H. (1971). In: Meth. Biochem. Analysis (Glick, D., ed), Vol. 19, 1, Wiley (Interscience), New York
76. Vesterberg, O. (1970). In: Protides Biol. Fluids (Peters, H., ed.), Vol. 17, 383, Pergamon, London

77. Maurer, H.R. (1968). Diskelektrophorese. Walter de Gruyter-Verlag, Berlin
78. Weber, K. and Osborn, M. (1969). J. Biol. Chem. 244, 4406
79. Vanaman, T.C., Wakil, S.J. and Hill, R.L. (1968). J. Biol. Chem. 243, 6420
80. Moore, S. and Stein, W.H. (1963). Meth. Enzym. 6, 819
81. Hirs, C.H.W. (1967). Meth. Enzym. 11, 197
82. Ailhaud, G.P., Vagelos, P.R. and Goldfine, H. (1967). J. Biol. Chem. 242, 4459
83. Ellman, G.L. (1959). Arch. Biochem. Biophys. 82, 70
84. Habebb, A.F.S.A. (1972). In: Meth. Enzym. XXV, 457
85. Andrews, P. (1965). Biochem. J. 96, 595
86. Shapiro, A.L., Vinuela, E. and Maizel, J.V., Jr. (1967). Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815
87. Weber, K., Pringle, J.R. and Osborn, M. (1972). Meth. Enzym. 26, 3
88. Neville, Jr., D.M. and Glossmann (1974). Meth. Enzym. 32, 92
89. Majerus, P.W. (1968). Science 159, 428
90. Abita, J.P., Lazdunski, M. and Ailhaud, G.P. (1971). Eur. J. Biochem. 23, 412
91. Schulz, H. (1972). Biochem. Biophys. Res. Comm. 46, 1446
92. Eddy, A.A. and Williamson, D.H. (1957). Nature 197, 1252
93. Cabib, E. (1971). Meth. Enzym. 22, 120
94. Gregory, D.W., Polakis, E.S. and Bartley (1967). Meth. Enzym. 12 A, 469
95. Duell, E.A., S. Inoue und Utter, M.F. (1964). J. Bacteriol. 88, 1762
96. Pirson, W. and Lynen, F. (1971). Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 352, 797
97. Kovac, L, Groot, G.S.P. and Racker, E. (1972). Biochim. Biophys. Acta 256, 55
98. Potter, V.R. and Elvehjem, C.A. (1936). J. Biol. Chem. 114, 495
99. deDuve, C. (1971). J. Cell. Biol. 50, 20 D
100. Snitka, T.K. and Seligman, A.M. (1971). Ann. Rev. Biochem. 40, 375

101. Linnane, A.W. and Haslam, J.M. (1970). In: Current Topics in Cellular Regulations (Horecker, B.L. and Stadtman, E.R., edts.), Vol. 2, 101, Academic Press, New York, London

102. Linnane, A.W., Haslam, J.M., Lukins, H.B. and Nagley, P. (1972). Ann Rev. Microbiol. 26, 163

103. MacQuillan, A.M. and Halvorson, H.O. (1962). J. Bacteriol. 84, 31

104. Polakis, E.S. and Bartley, W. (1965). Biochem. J. 97, 284

105. Bloomfield, D.K. and Bloch, K. (1960). J. Biol. Chem. 235 337

106. Andreason, A.A. and Stier, T.J.B. (1953). J. Cell. Comp. Physiol. 41, 23

107. Andreason, A.A. and Stier, T.J.B. (1954). J. Cell. Comp. Physiol. 43, 271

108. Wallace, P.G., Huang, M. and Linnane, A.W. (1968). J. Cell. Biol. 37, 207

109. Boardman, N.K. and Linnane, A.W.(eds) (1970). Autonomy of Chloroplasts and Mitochondria. North-Holland Publ., Amsterdam

110. Mudd,J.B. and McManus, T.T. (1962). J. Biol. Chem. 237, 2057

111. Stumpf, P.K. and James, A.T. (1962). Biochim. Biophys. Acta 57, 400

112. Stumpf, P.K., Bove, J.M. and Goffeau, A. (1963). Biochim. Biophys. Acta 70, 260

113. Brooks, J.L. and Stumpf, P.K. (1966). Arch. Biochem. Biophys. 116, 108

114. Pfaff, E., Klingenberg, M. and Heldt, H.W. (1965). Biochim. Biophys. Acta 104, 312

115. Pfaff, E., Klingenberg, M., Ritt, E. and Vogell, W. (1968). Eur. J. Biochem. 5, 222

116. Smoly, J.M., Kuylenstierna, B. and Ernster, L. (1970). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 66, 125

117. Parsons, D.F., Williams, G.R. and Chance, B. (1966). Ann. N.Y. Acad. Sci. 137, 643

118. Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L. and Bergstrand, A. (1967). J. Cell. Biol. 32, 415
119. Schnaitman, C. and Greenawalt, J.W. (1968). J. Cell. Biol. 38, 158
120. Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L. and Bergstrand, A. (1967). Meth. Enzym. 10, 448
121. Lynen, F. (1969). Meth. Enzym. 14, 17
122. Pirson, W., Schuhmann, L. und Lynen, F. (1973). Eur. J. Biochem. 36, 16
123. Hess, S. (1976). Diss. Universität München
124. Jencks, W.P. (1962). In: "The Enzymes" (Boyer, P.D., Lardy, H. and Myrbäck, K., edts.), 2nd edition, Vol. 6, S. 380, Academ. Press, New York and London
125. Orme, Th.W., J. McIntyre, Lynen, F., Kühn, L. und Schweizer, E. (1972). Eur. J. Biochem. 24, 407
126. Bar-Tana, J. and Shapiro, B. (1964). Biochem. J. 93, 533
127. Norum, K.R,, Farstad, M. und Bremer, J. (1966). Biochem. Biophys. Res. Comm. 24, 797
128. Lippel, K. and Beattie, D.S. (1970). Biochim. Biophys. Acta 218, 227
129. Van Tol, A. and Hülsmann, W.C. (1970). Biochim. Biophys. Acta 223, 416
130. Aas, M. (1971). Biochim. Biophys. Acata 231, 32
131. Lipmann, F. and Tuttle, L.C. (1950). Biochim. Biophys. Acta 4, 301
132. Kornberg, A. and Pricer, W.E. (1953). J. Biol. Chem. 204, 329
133. Hill, U.T. (1947). Anal. Chem. 19, 932
134. Parsons, D.F. and Williams, G.R. (1967). Meth. Enzym. 10, 443
135. Whereat, A.F., Orishimo, M.V. and Nelson, J. (1969). J. Biol. Chem. 244, 6498
136. Schweizer, E. (1963). Diss. Universität München
137. Weithmann, K.U. (1974). Diss. Universität München
138. Arnstadt, K.-I. (1973). Diss. Universität München
139. Matsumura, S. (1970). Biochem. Biophys. Res. Comm. 38, 238

140. Krippahl, G., unveröffentlichte Ergebnisse
141. Nugteren, D.H. (1965). Biochim. Biophys. Acta 106, 280
142. Stoffel, W. (1965). In: Lipoide, 16. Coll. Ges. Physiol. Chem., Mosbach 1965, Springer-Verlag, 64
143. Guchait, R.B., Putz, G.R. and Porter, J.W. (1966). Arch. Biochem. Biophys. 117, 541
144. Podack, E.R., Lakomek, M., Saathoff, G. and Seubert, W. (1974). Eur. J. Biochem. 45, 13
145. Bloch, K. and Vance, D. (1977). Ann. Rev. Biochem. 46, 263
146. Aeberhard, E. and Meukes, J.H. (1968). J. Biol. Chem. 243, 3834
147. Harlan, W.R., and Wakil, S.J. (1963). J. Biol. Chem. 238, 3216
148. Colli, W., Hinkle, P.C. and Pullman, M.E. (1969). J. Biol. Chem. 244, 6432
149. Podack, E.R. and Seubert, W. (1972). Biochim. Biophys. Acta 280, 235
150. Seubert, W. (1970). Naturw. 57, 443
151. Southwell-Keely, P.T. and Lynen, F. (1974). Biochim. Biophys. Acta 337, 22
152. Numa, S., persönliche Mitteilung
153. Greull, G. (1973). Diss. Universität München
154. Ray, T.K. and Cronan, jr., J.E. (1976). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 73, 4374
155. Ailhaud, G.P. and Vagelos, P.R. (1966). J. Biol. Chem. 241, 3866
156. Goldfine, H., Ailhaud, G.P. and Vagelos, P.R. (1967). J. Biol. Chem. 242, 4466
157. Van den Bosch, H., and Vagelos, P.R. (1970). Biochim. Biophys. Acta 218, 233
158. Ray, T.K. and Cronan, J.E., jr. (1975). J. Biol. Chem. 250, 8422
159. Goldfine, H. and Ailhaud, G.P. (1971). Biochem. Biophys. Res. Comm. 45, 1127
160. Lueking, D.R. and Goldfine, H. (1975). J. Biol. Chem. 250, 8530

161. Wallace, P.G., Huang, M. and Linnane, A.W. (1968). J. Cell. Biol. 37, 207
162. Jollow, D., Kellerman, G.M. and Linnane, A.W. (1968). J. Cell. Biol. 37, 221
163. Paltauf, F. and Schatz, G. (1969). Biochem. 8, 335
164. Van den Bosch, H., Williamson, J.R. and Vagelos, P.R. (1970). Nature 228, 338
165. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, T., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. and Pfleiderer, G. (1953). Z. Naturf. 8b, 555
166. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). J. Biol. Chem. 193, 265
167. Sumper, M. (1970). Diss. Universität München
168. Simon, E.J. and Shemin, D.J.(1953). J. Amer. Chem. Soc. 75, 2520
169. Seubert, W., unveröffentlichte Versuche
170. Seubert, W. (1960). Biochem. Prep. 7, 80
171. Eggerer, H. und Lynen, F. (1962). Biochem. Z. 335, 540
172. Wieland, Th., Maul, W. und Möller, E.F. (1955). Biochem. Z. 327, 85
173. Hagen, A. (1963). Diss. Universität München
174. Gehring, U. (1964). Diss. Univ. München
175. Schwyzer, R. (1952). Helv. Chem. Acta 35, 1903
176. Michal, G. und Bergmeyer, H.U. (1962). In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., ed.), Verlag Chemie, Weinheim, 517
177. Buckel, W. und Eggerer, H. (1965). Biochem. Z. 343, 29
178. Ziegenhorn, J. und Lynen, F. (1974). In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U. ed.), 3. Aufl., S. 2083, Verlag Chemie, Weinheim
179. Pirson, W. (1970). Diss. Universität München
180. Srere, P.A. (1969). Meth. Enzym. 13, 3
181. Parvin, R. (1969). Meth. Enzym. 13, 16
182. Wharton, D.C. and Griffiths, D.E. (1962). Arch. Biochem. Biophys. 96, 103
183. Tzagoloff, A. (1969). J. Biol. Chem. 244, 5020

184. Charm, S.E. (1971). Meth. Enzym. 12, 476
185. Kunitz, M. und Simms, H.S. (1928). J. gen. Physiol. 11, 641
186. Gebrauchsanleitung, LKB-Produkte, Bromma, Schweden
187. Bedienungsanleitung "UltraPhor", Colora, Lorch
188. Aminosäureanalyse, Handbuch, Biotronik
189. Scheidegger, J.J. (1955). Int. Arch. Allergy 7, 103

LEBENSLAUF

| | |
|---|---|
| Name | Wolfram Winnewisser |
| geb. am | 18. April 1942 in Heidelberg |
| Eltern | Alfred Winnewisser, Dozent an der Pädagogischen Hochschule i.R., Lydia Winnewisser, geb. Diehl, Lehrerin a.D. |
| 1948 - 1952 | Volksschule, Heidelberg |
| 1952 - 1961 | Kurfürst-Friedrich-Gymnasium (humanistisch), Heidelberg |
| März 1961 | Reifeprüfung |
| 1961 - 1963 | Studium der Chemie, Universität Heidelberg |
| 1963 - 1964 | Studium der Chemie und Medizin, Universität Heidelberg |
| Juni 1964 | Diplom-Chemiker-Vorprüfung |
| 1964 - 1969 | Studium der Chemie, Universität München |
| April 1967 | Diplom-Hauptprüfung |
| Juni 1969 | Diplom in Chemie |
| Sept. 1967 - April 1974 | Anfertigung der Diplom- und Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Universität München, am Max-Planck-Institut für Zellchemie, München, und am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Feodor Lynen |
| 1971 - 1975 | Wissenschaftlicher Assistent an den Max-Planck-Instituten für Zellchemie und Biochemie in München bzw. Martinsried |
| 1975 - 1977 | Verwalter der Dienstgeschäfte eines wiss. Ass., Universität München |
| seit 1978 | Wissenschaftlicher Angestellter, Universität Ulm |